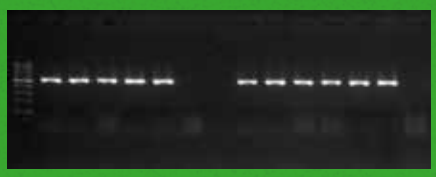
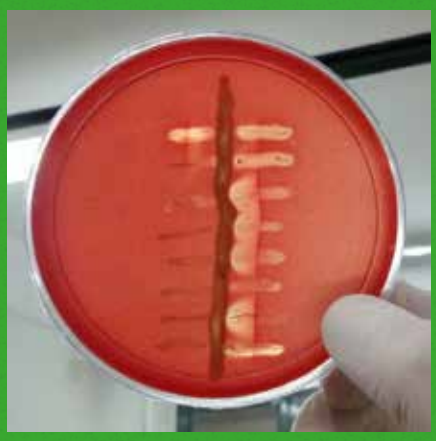
las infecciones bacterianas y el laboratorio de bacteriología





Segunda edición 2015
(actualizada y ampliada)

marta vergara *y col.*

Editorial Universitaria

las infecciones bacterianas y el laboratorio de bacteriología

segunda edición 2015
(actualizada y ampliada)

marta vergara ***y cols.***

EDITORIAL UNIVERSITARIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES

marta vergara
Ex Profesora Titular Catedra Bacteriología
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales

Especialista Internacional Bacteriología

marina quiroga
Profesora Adjunta. Cátedra de Bacteriología.
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales
Universidad Nacional de Misiones
Doctora de la Universidad de Buenos Aires área Microbiología

pegels eduardo
Prof. Adjunto Interino Cátedra de Bacteriología
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales
Universidad Nacional de Misiones
Especialista Microbiología

patricia noemi oviedo
Jefe de Trabajos Prácticos Cátedra de Bacteriología
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales
Universidad Nacional de Misiones
Doctor en Ciencias de Salud

margarita laczeski
Jefe de Trabajos Prácticos Cátedra de Bacteriología
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales
Universidad Nacional de Misiones
Especialista en Microbiología AAM
Doctorando de la Universidad Nacional de Tucumán.

mabel rinaldi
médica infectóloga
Posadas, Misiones

"los únicos bienes intangibles son los que se acumulan en el cerebro y en el corazón y cuando ellos faltan, ningún tesoro los sustituye".
José Ingenieros

Este libro atualización y ampliación de la primera edición está dedicado a mis alumnos, cuyos pasos por la Cátedra de Bacteriología lo inspiraron.
-por ellos y para ellos-

Editorial Universitaria
Universidad Nacional de Misiones

San Luis 1870
Posadas - Misiones - Tel-Fax: (03752) 428601
Correos electrónicos:
direccion@editorial.unam.edu.ar

Colección: Ediciones Especiales

Coordinación de la edición: Claudio O. Zalazar

Diseño y armado de tapa e interiores: Francisco A. Sánchez

Corrección de estilo: Ana María Ballestreros

Las infecciones bacterianas y el laboratorio de bacteriología / Marta Vergara ... [et al.]. - 2a edición especial - Posadas: EdUNaM - Editorial Universitaria de la Universidad Nacional de Misiones, 2015.
Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga
ISBN 978-950-579-399-0

1. Infecciones Bacterianas. 2. Diagnóstico bacteriológico. 3. Tratamiento Médico. I. Vergara, Marta
CDD 617.22

Hecho el depósito de la ley 11723
Impreso en Argentina
ISBN: 978-950-579-399-0

Editorial Universitaria
Universidad Nacional de Misiones, Posadas, 2015.
Todos los derechos reservados para la primera reimpresión.

ÍNDICE

Prefacio.....11

Capítulo 1.....13
• El camino al Daño ■ marta vergara.....13
Revisaremos algunos conceptos.....13
Mantenimiento de un reservorio.....18
El daño al huésped: el encuentro- el ingreso.....18
Trasmisión por el aire.....19
Trasmisión por contacto.....20
Trasmisión por vehículo.....20
Trasmisión por vectores.....20
El daño al huésped.....21
La colonización – la adherencia.....21
La regulación de los factores de virulencia.....22
Las islas de patogenicidad.....23
La adherencia.....25
Las biopelículas o el slime.....28
El daño al huésped: la invasión- las toxinas.....29
Endotoxinas.....32
Exotoxinas.....33
Los mecanismos de defensa del huésped.....37
Bibliografía consultada.....40

CapÍtulo 2. Infecciones en el Tracto Urinario (ITU).....41
• Las bacterias y la virulencia ■ marta vergara.....41
Las bacterias.....42
Escherichia coli.....42
Proteus spp.....44
Klebsiella spp.....46
Enterococcus spp.....48
Staphylococcus spp.....50
El camino al Daño.....52

• La clínica y el tratamiento ■ mabel rinaldi.....59
Clasificación de las infecciones urinarias según su localización.....60
Clasificación según la ausencia o presencia de factores.....60
Infección urinaria alta.....63
Infecciones del tracto urinario en pediatría.....67
El tratamiento.....68
Infección urinaria recurrente.....70
Pielonefritis aguda.....72
Infección urinaria complicada.....73
Infección urinaria en la embarazada.....74
Bacteriuria asintomática.....76
Resumen de conducta diagnóstica y tratamiento.....77

• El laboratorio ■ patricia oviedo
Bibliografía consultada 102

CapÍtulo 3. Infecciones del Tracto Genital (ITG) 105
• Las bacterias y la virulencia ■ marta vergara 105
La población microbiana normal vaginal 105
Neisseria gonorrhoeae 109
El camino al Daño 113
Vaginosis bacteriana (VB) 115
Chlamydia trachomatis 117
El camino al Daño 119
Haemophilus ducreyi 123

• La clínica y el tratamiento ■ mabel rinaldi 124
Etiología 124
Infección por *Neisseria gonorrhoeae* 125
Manifestaciones clínicas 126
Relación con el VIH 127
Diagnóstico 128
Evolución y pronóstico 129
Tratamiento 129
Uretritis 129
Infección por *Chlamydia trachomatis* 130
Tratamiento 131
Úlceras genitales 134
Chancro blando 134
Diagnóstico 135
Tratamiento 135

• El laboratorio ■ marina quiroga 136

Bibliografía consultada 164

CapÍtulo 4. Infecciones: Vías Respiratorias (IVR) 169
Las bacterias y la virulencia ■ marta vergara 169
Faringitis estreptocóccica 170
Streptococcus pyogenes- grupo A 170
El camino al Daño 174
Neumonía Aguda 180
el camino al Daño 180
Las bacterias 181
Streptococcus pneumoniae (neumococo) 183
El camino al Daño 185
Pseudomonas aeruginosa 190
El camino al Daño 193
Corynebacterium diphtheriae 197
El camino al Daño 198
Invasividad 198
Toxicidad 199

Mycobacterium tuberculosis 200

• La clínica y el tratamiento ■ mabel rinaldi 206
Diagnóstico 207
Examen físico 208
Examen de esputo 208
Examen radiológico 209
Etiología 210
Tratamiento 212
Factores pronósticos de morbimortalidad 213
Neumonías que no responden al tratamiento 218
Inmunoprevención 219
Tuberculosis tratamiento 221

• El laboratorio ■ margarita laczeski 223

Bibliografía consultada 270

CapÍtulo 5. Infecciones de Piel y Partes Blandas (IPPB) 273
• Las bacterias y la virulencia ■ marta vergara 273
Streptococcus pyogenes- grupo A (SGA) 277
El camino al Daño 278
Staphylococcus spp. 279
El camino al Daño 285
Las enterotoxinas 286
Clostridium perfringens 295
El camino al Daño 297

• La clínica y el tratamiento ■ mabel rinaldi 300
Infecciones de piel y partes blandas con repercusión sistémica 302
Impétigo 303
Tratamiento 303
Abscesos 304
Forúnculos-carbunclos 305
Erisipela 306
Celulitis 308
Infecciones necrotizantes 311
Fascitis necrotizante 313
Gangrena de Fournier 319
Miónecrosis clostridial 319
Infección de herida quirúrgica 320
Infección en pacientes inmunocomprometidos 324
Infección de tejidos blandos por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad (SAMR-CA) 327

• El laboratorio ■ eduardo pegels 334

Bibliografía consultada 373

CapÍtulo 6. Infecciones del Sistema Nervioso Central (SNC)- meningitis 377
• Las bacterias y la virulencia ■ marta vergara 377
El camino al Daño 377
Haemophilus influenzae 380
Streptococcus pneumoniae 385
Neisseria meningitidis (meningococo) 387

• La clínica y el tratamiento ■ mabel rinaldi 392
Definición 392
Signos y síntomas iniciales de pacientes con meningitis bacteriana. 394
Manifestaciones clínicas 396
Tinción de Gram 400
Determinación de la concentración de lactato 400
Determinación de concentración de proteína C reactiva (PCR) 401
Tratamiento 401
Complicaciones 403
Terapia adicional con dexametasona 404
Segunda punción lumbar 405
Prevención 405
Profilaxis 407

• El laboratorio ■ margarita laczeski 408

Bibliografía consultada 443

Capitulo 7. Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) 445
Las bacterias y la virulencia ■ marta vergara 445
El camino al Daño 448
ECEI 449
ECEP 450
ECEA 453
ECEH 454
ECET 459
Shigella spp. 461
Salmonella spp. 466
Campylobacter spp. 473
Vibrio cholerae 477
La bacteria 479
Factores de Colonización 485
La respuesta de la OMS 492
Recomendaciones para el público y los viajeros 493

La clínica y el tratamiento ■ mabel rinaldi 493
Características de las diarreas 495
Shigelosis 496
Salmonelosis 498
Campylobacter spp. 499
E. coli enterohemorrágico (ECEH) 501
Diareas enterotoxigénicas 502
Tratamiento 502

Cólera en América....503
Plan A- Paciente normohidratado. 506
Plan B- Tratamiento en deshidratación leve y moderada....507
Plan C- Paciente deshidratado grave sin shock....507

• El laboratorio ■ patricia oviedo.... 508

Bibliografía consultada....528

CapÍtulo 8. Las infecciones bacterianas perinatológicas....533
• Las bacterias y la virulencia ■ marta vergara.... 533
• tratamiento antimicrobiano: mabel rinaldi....533
Las bacterias....533
Streptococcus agalactiae, ß- hemolítico grupo B (SGB)....533
El camino al Daño....537
Listeria monocytogenes....542
El camino al Daño....544
Treponema pallidum 546
El camino al Daño....549
* Sífilis Primaria: 552
* Sífilis secundaria:....553
* Sífilis asintomática o latente:....554
* Sífilis terciaria:....555
* La sífilis congénita 555
Micoplasmas genitales....558
El camino al Daño 561

• El laboratorio ■ margarita laczeski 563

Bibliografía consultada 588

Capítulo 9....593
• Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos ■ marina quiroga.... 593
Metodo de determinación de sensibilidad antimicrobiana por difusion con discos 594
A1- Medio de cultivo 596
A2- Conservación de los discos/tabletas de antimicrobianos (ATM)....598
A3- Turbidez estándar para la preparación del inóculo 598
A4- Procedimiento para realizar el ensayo de difusión por discos....599
A5- Antimicrobianos seleccionados 603
A6- Lectura de las placas e interpretación de resultados....604
A7- Verificación de los resultados 609
A8- Control de calidad....610
A9- Procedimiento con microorganismos fastidiosos 613
Metodos de determinacion de sensibilidad antimicrobiana por dilución....617
B1. Agentes antimicrobianos 620
B2. Número de concentraciones a ensayar 624
B3. Turbidez estándar para la preparación del inóculo....625
B4. Metodo de dilucion en agar....625
B5. Metodo de dilución en caldo (macro y microdilución)....630

B5.1. Medio de cultivo....630
B6- Control de calidad....637
B7- Procedimiento con microorganismos fastidiosos....641
C- metodo de determinacion de sensibilidad antimicrobiana por ensayo epsilométrico (E-test)..643
D- metodos especiales para la determinacion de sensibilidad antimicrobiana 645
D1- Concentración bactericida mínima (CBM)....646
D2- Poder bactericida del suero (PBS) y Poder inhibitorio del suero (PIS)....648
E- Metodos fenotipicos para la deteccion de mecanismos de resistencia 651
E1- Bacilos gram negativos no fastidiosos 656
E1a- Detección de ß-Iactamasas de espectro extendido (BLEE) en enterobacterias....656
E1b- Ensayos para la detección de cepas sospechosas de producir carbapenemasas 662
E1c- Ensayos para la detección de cepas sospechosas de producir ß-lactamasas AmpC....670
E1d- Propuesta de SADEBAC para la detección fenotípica de mecanismos
de resistencia a E2- *Staphylococcus* spp. 677
E3- *Enterococcus* spp. 685
E4- Microorganismos fastidiosos 692

Bibliografía consultada....700

Anexo Gráfico....707

Prefacio

> "hoy tratamos que la ciencia sea en un lenguaje ameno, y eso es desacartonar la ciencia. El científico que habla en difícil deja mucho que desear. Hablar en difícil es fácil, pero hablar fácil de lo difícil es lo complicado".
>
> Dr. C Schvezov. Docente Investigador UNAM.

El por que de esta nueva edición...

La primera Edición de este libro tuvo un buen recibimiento por los estudiantes, personal docente e incluso profesionales no docentes. Esto motivó una revisión y actualización.

Fue fundamental el formato de la primera edición, - la virulencia- la clínica – el tratamiento y el diagnóstico bacteriológico- el que se mantuvo en esta nueva presentación.

Atendiendo a la necesidad de "el pensar en el otro" agregamos un capítulo "Las infecciones bacterianas perinatológicas"… donde nos extendemos sobre "la enfermedad más grave que puede tener el ser humano en sus primeras horas de vida.

Preocupados ante lo que la OMS en su informe global sobre "Vigilancia: Resistencia a los Antimicrobianos" nos dice…" una era post.antibióticos en la que las infecciones comunes y las heridas menores pueden matar, lejos de ser una fantasía apocalíptica, es una posibilidad muy seria

para el siglo XXI" agregamos otro capítulo que consideramos fundamental: "Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos".

El anhelado logro con esta nueva edición: el conocer actualizados los mecanismos de las principales enfermedades bacterianas , la clínica, el tratamiento y el diagnóstico de laboratorio.

Esto posibilitara la realización de estudios bacteriológicos y su interpretación adecuada y oportuna que colaborarán con la clínica y la instauración o no de tratamientos adecuados. Por ello y para lograrlo es necesario introducir en nuestras prácticas diarias en el aula, en el laboratorio, con los pacientes, el tema de la ética en el ejercicio de las mismas, de la "ética de la eficiencia".

Nos dice Antoni Trilla, epidemiólogo: "es ético ser eficiente(emplear los recursos necesarios limitados del mejor modo posible y no es ético ser ineficiente".

Que estas premisas acompañen siempre nuestras prácticas con nuestros alumnos y pacientes.

marta vergara

CAPÍTULO 1

Revisaremos algunos conceptos

Si un **simbionte** perjudica o vive a expensas de otro organismo, se denomina **parásito** y la relación establecida, **parasitismo**.

Siguiendo en esta asociación se denomina **huésped** al cuerpo de un animal sobre el que va a actuar el parásito.

Todo organismo que puede producir enfermedad se denomina **patógeno**.

Una **enfermedad** es todo cambio producido en el huésped, de manera que pasa de un estado sano a otro anormal, no sano, en el que parte o la totalidad de su cuerpo no se encuentra en equilibrio o no puede realizar sus funciones normales.

Las etapas a cumplir en el **proceso infeccioso** relacionado con **enfermedades bacterianas** son: la bacteria debe **ser trasmitida** a un huésped susceptible- la bacteria **debe fijarse** y /o **colonizar** al huésped- la bacteria debe **crecer y multiplicarse** dentro o sobre el huésped- la bacteria debe **impedir o interferir** en las actividades fisiológicas normales del huésped.

Un resultado importante de la conservación de los genes cromosomales es que las bacterias son clonales. Solo uno o unos pocos tipos clonales de algunas bacterias patógenas existen en el ambiente.

Durante la coevolución con los huéspedes humanos, algunas bacterias patógenas han desarrollado complejos mecanismos de transducción de señales para regular los genes necesarios para la virulencia.

Muchas bacterias son patógenas porque poseen grandes segmentos de ADN denominados islas de patogenicidad que llevan genes responsables de la virulencia.

Dos categorías distintas de enfermedad pueden ser distinguidas en base al papel que juega la bacteria en el proceso que provoca la enfermedad: infección (invasión) e intoxicación.

Las toxinas producidas por las bacterias patógenas son exotoxinas o endotoxinas.

> "Las bacterias y los virus están constantemente desarrollando y produciendo mecanismos únicos que les permitan escapar del arsenal de defensas del huésped". (Prescott- Harley- Klein)

> "La patogenicidad no es la regla. De hecho se produce con tan poca frecuencia y concierne a un número tan reducido de especies, teniendo en cuenta la enorme población bacteriana que vive en la tierra, que resulta insólita. La enfermedad suele desarrollarse como consecuencia de "negociaciones" poco concluyentes para el establecimiento de una relación simbiótica, un paso más allá de la frontera entre simbiosis y parasitismo, dado por uno u otro organismo; en definitiva, una interpretación biológica errónea de las barreras naturales"(Lewis Thomas)

> **La comprensión entre las acciones de un huésped y un microorganismo es esencial para el abordaje y control de la mayoría de los procesos infecciosos.**

> **Es por todo ello, necesario definir y diferenciar los términos "infección·" de "enfermedad infecciosa".**

El término "**infección**", refiere a la colonización, multiplicación, invasión o persistencia de un patógeno en el huésped.

El término "**enfermedad infecciosa**" refiere a cualquier desviación de la salud por la que parte o la totalidad del huésped no puede realizar sus funciones normales, debido a un agente infeccioso o a sus productos. Es decir es una infección que causa daño al huésped, daño que origina signos clínicos y síntomas de enfermedad.

En contraste con lo anterior, cuando una bacteria se establece en el huésped sin causar enfermedad, como por ejemplo pueden hacerlo microorganismos residentes, el proceso se denomina "**colonización**".

Por lo dicho, la infección no necesariamente conduce a enfermedad

Casadeball y Pirofski propusieron ya en 2003 la teoría de la respuesta-daño de la patogenia microbiana. Se basa en los siguientes puntos:

- La patogenia microbiana es el resultado de la interacción de un microorganismo y el huésped
- El daño en el huésped resulta de factores del microorganismo y de la respuesta inmune del huésped.
- El microorganismo puede ser erradicado por variados mecanismos no inmunes como el parpadeo, el flujo de orina, las lágrimas, y luego por mecanismos inmunes innatos como la fagocitosis por neutrófilos polimorfonucleares o por los adaptativos como la respuesta humoral y celular.

La infección puede progresar al estado de enfermedad que es el observado en el huésped después de que cierto daño ha ocurrido.

La mayoría de las infecciones son seguidas por multiplicación del microorganismo en el hospedero.

Un concepto de patógeno (del griego *patho* , enfermedad y *gennan*, producir): cualquier microorganismo con capacidad de causar enfermedad.

Diversos mecanismos utilizan los microorganismos para producirla.

Entre los diversos mecanismos, algunos utilizan factores de virulencia, que dependen de la estructura celular como cápsulas, fimbrias, lipopolisacárido (LPS) y otros componentes de la pared celular.

Otros factores de virulencia dependen de sustancias secretadas por las bacterias que tienen como finalidad dañar al huésped o proteger a las bacterias de las defensas del mismo.

La **patogenicidad** de un microorganismo es la capacidad para producir enfermedad. Se utiliza el término para describir o comparar especies.

La patogénesis es un proceso multifactorial que depende de varios factores:

- Estado inmune del huésped
- Naturaleza de la especie (sus factores de virulencia)
- El inóculo en la exposición inicial

Estos mecanismos, muchos de ellos conocidos como factores de virulencia, pueden depender de la estructura celular como cápsulas, fimbrias, lipopolisacárido (LPS) u otros componentes de la pared celular o bien de-

pender de sustancias secretadas por las bacterias que tienen como finalidad dañar al huésped o proteger a las bacterias de las defensas del mismo.

Los factores de virulencia se asocian a propiedades que le posibilitan a los microorganismos establecerse por sí mismos en el huésped, determinando la magnitud del daño.

Hay microorganismos llamados "patógenos primarios" que normalmente causan enfermedad en personas susceptibles, normoinmunes y existen otros patógenos llamados "patógenos oportunistas o potenciales", que pueden formar parte de la flora habitual del huésped o pueden tener vida independiente, que se comportan como patógenos en ciertas circunstancias especiales como un sistema inmunitario debilitado o comprometido.

Microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, que no constituye parte de la microbiota comensal en el hombre y generalmente no produce enfermedad en normoinmunes, en individuos inmunodeprimidos provoca un daño, muchas veces de gravedad.

La virulencia microbiana resulta de la interacción entre el microorganismo y el huésped. Un microorganismo puede ser de alta virulencia en un huésped susceptible pero de baja virulencia en un huésped inmunizado.

Las bacterias poseen mecanismos de patogenicidad específicos que emergen al superar las defensas de un hospedero. Un microorganismo patógeno posee la capacidad de producir un daño, a cualquier nivel, en un organismo hospedero susceptible.

La virulencia es una medida cuantitativa de la patogenicidad y se mide por el número de microorganismos necesarios para causar una enfermedad, es decir, es el grado de patogenicidad.

El término **"virulencia"** (del latín *virulentia*, de *virus*, veneno) define la habilidad de una bacteria para causar enfermedad. Mide la magnitud de la **patogenicidad** o de la posibilidad del patógeno de producirla. Se usa el término para describir o comparar cepas dentro de una misma especie.

Debido a la eficiencia de esos mecanismos una bacteria puede ser poco virulenta o muy virulenta.

En contraste con lo anterior, cuando una bacteria se establece en el huésped sin causar enfermedad, como por ejemplo puede hacerlo la microbiota residente, el proceso se denomina "**colonización"**.

Por lo dicho, la infección no necesariamente conduce a enfermedad.

Son varios factores los que inciden en las relaciones entre un microorganismo y el huésped: el número de microorganismos presentes en el huésped – la virulencia del microorganismo y el estado del sistema inmune del huésped.

El tiempo de multiplicación bacteriana dentro del huésped es un importante factor a tener en cuenta. Las bacterias que tienen tiempos de duplicación más acelerados causarán daño más rápido que aquellos de tiempos más lentos, en especial si se encuentran dentro de los fagocitos.

Esto no es así para aquellos agentes infecciosos que causan la misma enfermedad en todos los huéspedes infectados.

De todos modos, la severidad del daño depende, entre otros factores, de: la dosis infectante, la ruta de la infección, la edad del huésped, el sexo, el estado nutricional y los mecanismos de defensas humorales y celulares.

Es sabido que no todos los patógenos de una misma población bacteriana pueden producir idéntico daño, en magnitud y secuelas. Ejemplo de ello lo tenemos en *Streptococcus pneumoniae*, donde las cepas capsuladas son mucho más virulentas que las no capsuladas.

El daño que puede producir una bacteria transita, en términos generales, por dos mecanismos:

- un mecanismo **invasivo** dado por la habilidad de ciertas bacterias para penetrar, sobrevivir a las defensas, multiplicarse y diseminarse.
- un mecanismo **toxigénico** dado por la habilidad de ciertas bacterias de producir toxinas, ya sean solubles o asociadas a la célula bacteriana, las que pueden ser transportadas por la sangre o la linfa y causar efectos citotóxicos, aún a distancia del punto original de invasión.

Para que se establezca una enfermedad infecciosa bacteriana invasiva y/o toxigénica, es necesario que previamente tengan lugar una serie de eventos asociados a dichas bacterias:

- **Mantenimiento de un reservorio**.
- Poder ser transportadas al huésped, ya sea en forma directa o indirecta, **el encuentro y el ingreso**.
- **Adherirse**, multiplicarse en el huésped, **colonizar** y/o invadir al huésped: **la invasión-las toxinas**
- **Evadir**, en los inicios de estas etapas, las defensas del huésped.
- **Dañar** al huésped
- **Abandonar** al huésped, volver al **reservorio** o entrar en un **nuevo huésped.**

Mantenimiento de un reservorio

Mantenimiento de la fuente del patógeno, es decir mantenimiento de un lugar donde vivir antes y después de causar el daño, o sea el lugar desde el cual el patógeno se transmite al huésped. Puede ser directamente por el ambiente o indirectamente a través de un intermediario.

Esta fuente puede ser animada (seres humanos o animales) o inanimada (agua, suelo o alimentos). El reservorio más frecuente para las bacterias patógenas del hombre lo constituye el hombre, los animales o el ambiente.

Con frecuencia el hombre es la fuente animada más importante del patógeno y se denomina en ese estado: **portador**.

El portador es un individuo infectado que es una fuente potencial de infección para otros.

Puede ser un portador:

- activo (con enfermedad manifiesta)
- convalesciente(recuperado de su enfermedad pero albergando gran cantidad del patógeno)
- sano (alberga el patógeno pero no está enfermo)
- portador en estado de incubación(incubando el patógeno pero aún sin signos ni síntomas de enfermedad).

El daño al huésped: el encuentro- el ingreso

En el desarrollo de una enfermedad infecciosa, el camino que sigue esa bacteria para encontrar al huésped va a determinar muchas de las consecuencias que tendrá esa enfermedad.

El encuentro de la bacteria patógena con el huésped, en la gran mayoría de los individuos, se da en el momento del nacimiento, ya que en su vida intrauterina ha permanecido en la mayoría de los casos sin contacto con microorganismos, por la protección de las membranas fetales y de la placenta.

No obstante, algunos microorganismos como *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii* y algunos virus, pueden atravesar la placenta.

El encuentro del microorganismo con el huésped puede ser endógeno o exógeno.

La piel que recubre el cuerpo del huésped es su cobertura y resguardo de los daños del exterior y a su vez no sólo lo protege sino que funciona como un órgano de termorregulación.

Estas funciones son de relevancia al analizar los mecanismos que utilizan los microorganismos para establecerse y colonizarla e incluso invadirla.

El acceso a tejidos del huésped de bacterias habitantes habituales de la piel, como *Staphylococcus* spp. es un ejemplo de encuentro endógeno.

Si el encuentro es exógeno, los microorganismos se adquieren desde el exterior, del medio ambiente, por vía digestiva, respiratoria, contacto con otros individuos o animales. Pueden ser trasmitidos de diversas maneras:

Trasmisión por el aire

Cuando la trasmisión se realiza **por vía áerea**, las bacterias están suspendidas ya sea en el polvo o en núcleos de gotitas (partículas pequeñas de 1 a 4 μm de diámetro, que pueden permanecer en el aire durante horas o días y viajar largas distancias y que son resultantes de la evaporación de partículas más grandes), y viajan distancias mayores de un metro desde la fuente hacia el huésped. Los microorganismos pueden dispersarse por corrientes de aire a distancias más alejadas de un paciente fuente y este tipo de trasmisión requiere de un cuidadoso manejo del aire y la ventilación. La trasmisión de *Mycobacterium tuberculosis* se produce de esta manera.

Cuando la trasmisión es **por gotas**, la vía más frecuente es por contacto directo, de huésped a huésped mediante la tos, el estornudo, el contacto corporal, donde un individuo infectado va a infectar a otro. Las gotas son generadas desde una persona fuente, primariamente durante la tos, el estornudo o el habla y durante la realización de ciertos procedimientos tales como aspiración, broncoscopía. La trasmisión ocurre cuando las gotas generadas por la persona infectada son propaladas a una corta distancia y son depositadas en la conjuntiva o mucosa nasal o boca del huésped. Dado que las gotas no quedan suspendidas en el aire, no requieren manejo especial del aire y de la ventilación para prevenir la trasmisión. Enfermedades invasivas por *H. influenzae, N. meningitidis*, tos convulsa, neumonía por *Mycoplasmas,* enfermedades como la difteria, entre otras requieren de precauciones de gotas.

Trasmisión por contacto

En este tipo de trasmisión el patógeno (ya sea su fuente o reservorio) entra en contacto o se tocan.

Cuando el contacto es directo, persona a persona, ocurre ya sea por relaciones sexuales, besos, secreciones bucales o de piel como ampollas, la lactancia o a través de la placenta como sífilis, listeria, *Streptococcus agalactiae* (SGB) o bien contacto directo con animales o sus productos como la trasmisión de *Salmonella* y *Campylobacter*.

Cuando el contacto es indirecto la bacteria se trasmite desde el reservorio, mediante un intermediario usualmente inanimado como termómetros, ropa de cama, vajilla, etc. *Pseudomonas* spp. es frecuentemente asociado a este tipo de trasmisión.

Trasmisión por vehículo

Cuando la trasmisión es por vehículo, llamados fómites en epidemiología (objetos inanimados como ropa de cama, instrumental quirúrgico, vajilla para comer) una sola fuente trasmite la bacteria a varios huéspedes, pero la bacteria no se reproduce en la fuente.

Trasmisión por vectores

En este tipo de trasmisión de bacterias los vectores las pueden trasmitir ya sea en forma **externa** o **interna**.

Un ejemplo de trasmisión **externa**, pasiva, sin que se reproduzca la bacteria en el vector es el caso de *Shigella* spp. Trasmitida por las moscas en sus patas desde la fuente fecal a la comida.

En el caso de que la trasmisión sea **interna**, la bacteria viaja en el interior del vector, ya sea en fase encubierta como es el caso de la trasmisión de *Yersinia pestis*, agente de la peste, desde la rata al hombre, dentro de la pulga de la rata, donde la bacteria no sufre variaciones ni fisiológicas ni morfológicas.

El ingreso refiere al ingreso de los microorganismos en las cavidades corporales que comunican con el exterior, como la vía digestiva, respiratoria, urinaria, conjuntiva, donde ponen en juego diversos mecanismos para escapar a las defensas del huésped y no ser expulsados o eliminados. Este

ingreso representa para el microorganismo una vía más accesible que el de la piel intacta.

El ingreso puede llegar a tejidos más profundos, luego de atravesar la barrera epitelial.

Este último tipo de ingreso requiere de rupturas de la piel, ya sea por: traumatismos, abrasiones, pequeñas grietas, lesiones o úlceras en la mucosa, o lesiones titulares causadas por otros organismos como picaduras de insectos. Una vez que han penetrado los microorganismos , ayudados por sus propios productos específicos como enzimas (factores de virulencia), pueden ser transportados por leucocitos o macrófagos hacia tejidos más profundos.

El daño al huésped

La colonización – la adherencia

Una vez que la bacteria penetra en el organismo del hospedero, se debe adherir a las células de un tejido y, para ello, casi todas las bacterias cuentan con medios para lograrlo en la puerta de entrada.

Para que el ingreso de la bacteria sea exitoso y pueda establecerse y no ser eliminada por las defensas del huésped, debe colonizar las células y tejidos del mismo. Es decir, llegar a la situación donde el número de bacterias que nacen es mayor que la sumatoria de las que mueren y de las que son eliminadas del sitio elegido para colonizar, lo que depende de la capacidad de las bacterias para enfrentar los mecanismos de defensa que el huésped pone en juego y no ser arrastradas o eliminadas.

Este proceso de fijación, se denomina adherencia y es necesario para la patogenicidad bacteriana-ya que si no se adhieren, suelen ser eliminadas ya sea por secreciones mucosas y otros líquidos que bañan las superficies de los tejidos.

Por ello, "**colonización**" significa que la bacteria se ha establecido sobre o dentro del huésped.

De allí que la colonización, si bien no significa infección o daño a los tejidos, es el primer paso en el camino a la infección microbiana, si ésta va a ocurrir.

También para que la colonización de un patógeno sea exitosa en un huésped, debe encontrar un ambiente apropiado en pH, nutrientes, temperatura, potencial redox, etcétera.

Muchas bacterias pueden invadir células específicas donde se multiplican, otras pueden sobrevivir y multiplicarse en la sangre.

La regulación de los factores de virulencia

Tanto para adaptarse a una vida libre como a vivir dentro del cuerpo del huésped, muchas bacterias desarrollan complejos mecanismos de transducción de señales a fin de regular la expresión de los genes que codifican diversos factores de virulencia.

Es imprescindible que el patógeno perciba su entorno local en el huésped (entorno distinto al externo) a fin de establecer una relación con él que sea adecuada para dicha regulación y evitando su destrucción por los mecanismos de defensa del huésped.

Esta regulación, se realiza mediante los llamados "**los elementos reguladores globales** " que responden a señales ambientales, como la temperatura, y otras como la osmolaridad, el pH, y otros factores nutritivos necesarios para su crecimiento como la disponibilidad de hierro.

La concentración de hierro libre en el organismo es escasa ya que la mayor parte se encuentra unido a proteínas transportadoras de hierro como la transferrina. El hierro es un importante factor para el crecimiento de las bacterias las que lo captan mediante los sideróforos, compuestos de bajo peso molecular que quelan (atrapan) hierro. Los sideróforos son producidos por la bacteria y excretados al medio uniéndose al hierro y el complejo formado, hierro- sideróforo se une a receptores para sideróforo de la bacteria, el que luego de internalizado, se rompe y se libera hierro. Otra alternativa a la que recurren algunas bacterias para conseguir hierro es mediante la producción de toxinas las que al producir la muerte en células vecinas liberan hierro.

Un ejemplo de regulación está representado por la toxina de la difteria, (producida por *Corynebacterium diphtheriae*), su principal factor de virulencia. El gen de la toxina es transportado en el bacteriófago temperado β, y su expresión está regulada por la presencia de hierro.

Otro ejemplo de regulación: está descripto en *Vibrio cholerae*. La elaboración de la toxina, toxina del cólera (TC), su principal factor de virulencia, es dependiente de factores ambientales como la temperatura, pH, salinidad, entre otros.

Cuando el vibrio se encuentra a pH 6, la expresión de la toxina del cólera es mayor a que a pH 8 y es mayor a 30 que a 37ºC, lo que explica su mantenimiento en el medio ambiente, además.

Mientras se encuentra en estuarios salobreños y otros entornos salinos, el vibrio mantiene su viabilidad pero no produce la toxina, entre otras sustancias. Esto le posibilita ahorrar energía y sustratos al no elaborar sustancias que no necesita fuera del huésped. Para que la transición desde el ambiente externo al lumen intestinal humano sea exitosa para el patógeno, deben producirse importantes acontecimientos regulados genéticamente. Entre ellos, cambios en diversos parámetros, como la temperatura, el pH, la disponibilidad de hierro, todos parámetros necesarios para la expresión de sus factores de virulencia.

Otro ejemplo de estos reguladores globales, ocurre en *Bordetella pertussis*, agente etiológico de la tos convulsa. La expresión de los genes de virulencia se incrementa cuando la bacteria se encuentra a temperaturas del cuerpo humano (37ºC). Cuando la bacteria se encuentra a temperaturas inferiores de 25ºC, cesa la producción de toxinas y otros factores de virulencia. De esta forma, la bacteria puede persistir en la parte anterior de las fosas nasales y sobrevivir al no producir sustancias virulentas como las toxinas, contra las cuales el huésped ya tiene desarrollado anticuerpos. Por esta estrategia, la bacteria mantiene la cadena de diseminación de un huésped a otro, asegurando su supervivencia.

Los factores de virulencia pueden estar codificados por plásmidos, trasposones e islas de patogenicidad

Las islas de patogenicidad

Algunas bacterias gramnegativas patógenas desarrollaron complejas maquinarias para transferir proteínas(codificadas en su cromosoma) a células eucariotas que se conocen como sistemas de secreción de proteínas transportando los genes de la virulencia (segmentos de ADN) en lo que se denominan “islas de patogenicidad” , las que fueron adquiridas durante su evolución por transferencia horizontal de genes.

Los genes de virulencia que posibilitan a las bacterias gramnegativas secretar e inyectar proteínas de virulencia en la célula huésped lo logran mediante un complejo mecanismo denominado sistema de secreción. Se conocen los llamados sistemas de secreción de tipo II, III, IV, V y VI, y son transportados en una isla de patogenicidad.

La clasificación se basa en la naturaleza molecular de las maquinarias de transporte.

El sistema de secreción tipo I es un sistema simple, que consiste de solo tres subunidades de proteína: la proteína ABC, proteína de fusión a la membrana y proteína de la membrana externa que juntas forman un canal contiguo que cruza las membranas interiores y exteriores de las bacterias gramnegativas. Este sistema de secreción transporta diversas moléculas, como iones, medicamentos y proteínas.

Sistema de secreción tipo II : transporta proteínas del citoplasma al espacio periplásmico. Utiliza secretinas que son también proteínas.

Sistema de secreción tipo III: Un buen ejemplo para entender este sistema de secreción tipo III, el más frecuente en el daño producido por las enterobacterias y las pseudomonas, está graficado, por los investigadores como una "jeringa molecular" que sobresale de las bacterias, y haciendo un agujero en una célula cercana, le inyecta "chorros de proteínas" de virulencia en el citoplasma de la célula huésped.

Esta llamada "jeringa" atraviesa las membranas internas y externas de las bacterias gramnegativas, y según el tipo de proteínas inyectadas en las células, se desarrollarán diversas enfermedades.

Varios genes que se agrupan en estas islas, son los encargados de producir los componentes de la "jeringa".

Este sistema de secreción tipo III es altamente exitoso en la producción del daño, ya que es activado específicamente por contacto con células del huésped, evitando los mecanismos de defensa. Este sistema de secreción se expresa en especies bacterianas como *Salmonella enterica serovar typhi, Shigella* spp.*, Chlamydia* spp.*, Salmonella typhimurium, Yersinia* spp. y *Escherichia coli* enteropatogeno ECEP y enterohemorrágico ECEH (**Capítulo 7**).

El sistema de secreción tipo IV: es un sistema homólogo a la maquinaria de la conjugación bacteriana y puede transportar tanto DNA como proteínas.

Sistema de secreción tipo V: también denominado sistema autotransporte, posibilita por su extremo carboxilo cruzar la membrana externa al péptido y llegar al medio externo.

Sistema de secreción tipo VI: este sistema secreta nuevas proteínas recientemente descriptas en *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Estas islas de patogenicidad se encuentran sólo en bacterias patógenas y no se encuentran en las no patógenas de una misma especie o género, por lo que la virulencia es aún mayor.

Pseudomonas aeruginosa asociada a infecciones severas como fibrosis quística (F.Q.) es un ejemplo de estos mecanismos de virulencia.

Otro ejemplo lo constituye ECEP que posee genes que codifican para proteínas que desorganizan los microfilamentos de actina dentro de una célula del huésped, como la intestinal, en la región apical, produciendo la imagen de una copa con pedestal, donde la bacteria se une firmemente, siendo esta adhesión paso fundamental para iniciar el daño.

La adherencia

Una vez que la bacteria ha sido transmitida a un huésped en forma exitosa, la bacteria debe adherirse y colonizar sus células y tejidos.

La mayoría de las bacterias expresan más de un tipo de adhesinas y pueden estar ubicadas en el glucocáliz o en otras estructuras de la superficie microbiana, como por ejemplo los pili, las fimbrias y los flagelos, llamadas estructuras fimbriales en general, ya que son apéndices que consisten en subunidades de proteínas que están ancladas en la membrana externa de las bacterias gramnegativas. Las fimbrias pueden ser rígidas o flexibles.

Las adhesinas que no están en fimbrias son denominadas adhesinas afimbriales y algunos ejemplos son: proteínas de membrana externa de bacterias gram-negativas, ácidos lipoteicoicos de bacterias grampositivas y proteínas F y M de *Streptococcus* spp.

La función principal de las fimbrias es la de funcionar como soporte de las adhesinas, encargadas de reconocer a su receptor en la célula hospedera.

Las adhesinas son proteínas de la pared celular que tienen afinidad por los azúcares y que se fijan a moléculas receptoras específicas sobre la célula hospedadora y logran que las bacterias se adhieran íntimamente y poder así resistir a la eliminación física.

O sea que las adhesinas son estructuras de superficie o macromoléculas de la célula bacteriana, localizadas en su superficie, las que interactúan con el receptor, carbohidratos o péptidos de la superficie de las células del huésped.

Varias estructuras median como adhesinas: pili, fimbrias, LPS de las bacterias gramnegativas, cápsula, biopelículas, ácido lipoteicoico (ALT) de las bacterias grampositivas, entre las más relevantes.

La adherencia lograda puede ser específica, que se traduce como una adherencia irreversible, o inespecífica que se traduce como una adherencia reversible.

Ejemplos de una adherencia específica a células o tejidos del huésped:

- *Streptococcus mutans* con especial predilección por la placa dental, a la que se une por su adhesina (una glicosiltransferasa) al receptor, (una glicoproteína), produciendo las caries dentales. Este microorganismo no se lo encuentra, no adhiere, a la superficie de la lengua.
- *Streptococcus salivarius* que tiene predilección por las células epiteliales de la superficie de la lengua a la que se une a un receptor no identificado mediante su fimbria, el ALT, no produce enfermedad y no se lo encuentra en la placa dental.

Ejemplos de adherencia por determinadas especies, es el caso de *Neisseria gonorrhoeae* que sólo se encuentra en humanos, o *E. coli* K88 que sólo infecta a cerdos.

Algunas especies de cerdos son inmunes a la infección por *E. coli* K88, lo que demuestra una adherencia específica según variabilidad genética de las especies.

Escherichia coli, puede expresar diversas adhesinas, llamadas pilis o fimbrias, codificadas en distintas regiones del cromosoma o en plásmidos. Esta variabilidad genética le permite a *E. coli* adaptarse a los cambios ambientales y adherir a diversas superficies del huésped. Consecuencia de esta habilidad es la unión a diversos receptores.

La gran mayoría de las enterobacterias tienen fimbrias del tipo I (utilizan el carbohidrato D-manosa como aceptor, al que se unen).

Las fimbrias que se unen a residuos D-manosa de las células eucarióticas del huésped, con un tipo de unión que puede inhibirse competitivamente por alfa metilmanósidos, se designan manosa sensibles (MS). Manosa exógena agregada bloquea el receptor en el glóbulo rojo y no se produce aglutinación.

Otras cepas tienen fimbrias, por ejemplo *Escherichia coli* uropatógeno que causan infección del riñón, tienen receptores en las células epiteliales que contienen glucoesfingolípidos (componentes del glicocalix que rodea las células epiteliales). Esta unión que no se inhibe con la manosa, se designa manosa resistente (MR) (resisten a la manosa).

Ejemplo de estas fimbrias son las llamadas fimbrias P, porque el receptor es un elemento del complejo del antígeno del grupo sanguíneo P que se encuentra en los eritrocitos y en las células uroepiteliales. *E. coli* uropatógeno constituye un buen modelo de bacterias con estos tipos de fimbrias.

Streptococcus pyogenes con su fimbria, la proteina F y *Staphylococcus aureus* con su fimbria llamada proteína de unión, se unen a la fibronectina de la superficie de las células del huésped, produciendo el primero la faringitis estreptocócica y enfermedades varias el segundo.

Lograda la colonización mediante la adhesión, la bacteria puede iniciar el siguiente paso para llegar al daño: producir la enfermedad infecciosa.

A la enfermedad infecciosa se puede llegar ya sea por el camino de la invasión, mediante el desarrollo y la multiplicación del patógeno o bien, se puede llegar también mediante la acción de toxinas elaboradas por él.

Las cápsulas: muchas bacterias se rodean de uno u otro tipo de gel hidrofílico, el que si forma una capa razonablemente discreta se llama cápsula y si la misma es amorfa se denomina slime, de naturaleza polisacárida, como lo son la mayoría de las cápsulas.

Una forma de escapar a las defensas del huésped es mediante la formación de cápsulas.

Las cápsulas no afectan la viabilidad del microorganismo que la posee, pero sí aumentan significativamente su virulencia al resistir la acción de fagocitos. La cápsula constituye el antígeno K (capsular).

Streptococcus pneumoniae, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, son los típicos ejemplos de microorganismos cuya virulencia y resistencia a la fagocitosis está principalmente asociada a la cápsula.

Una efectiva respuesta del huésped contra los microorganismos capsulados, es la producción de anticuerpos que se unen a la cápsula y posibilitan la opsonización de los mismos. De ello deriva la eficacia de las vacunas construidas con material capsular en la prevención de enfermedades producidas por capsulados.

Algunos microorganismos como *Streptococcus pyogenes* producen cápsula de ácido hialurónico, que no es antigénica, por lo que el huésped no elabora anticuerpos contra ella. No obstante esta cápsula hace a las cepas más virulentas.

Algunas cepas de *Neisseria meningitidis*, tienen ácido siálico en su superficie bacteriana, un componente común con las glicoproteínas de las células del huésped, por lo que tampoco cumplen función de antígenos y el huésped no produce anticuerpos opsonizantes

Péptidos simples y algunas proteínas pueden ser constituyentes en reemplazo de polisacáridos en algunas circunstancias.

Los microorganismos que infectan regiones como el tracto digestivo, urinario, respiratorio y conjuntivas, desarrollan mecanismos que les permiten adherirse a los tejidos y escapar a las defensas del huésped, ya sean éstas mecánicas, químicas o humorales.

Las biopelículas o el slime

Las bacterias tienen la capacidad de agruparse en cúmulos, adherirse a superficies e ingresar y compartir los nutrientes disponibles.

Las bacterias así organizadas en comunidades constituyen masas de bacterias y sus productos extracelulares capaces de fijarse a superficies bióticas y abióticas generalmente húmedas y con materia orgánica, se denominan biopelículas.

Se trata de una asociación altamente beneficiosa para la comunidad de bacterias que se protegen así de la acción de antimicrobianos , otros agentes tóxicos y de las defensas del huésped, dado que las bacterias que forman la biopelícula tienen un metabolismo distinto a las células que crecen en medios líquidos (llamadas planctónicas).

Estos biofilms o biopelículas las encontramos en la placa dentaria en caso de mala higiene bucal, donde debido a que *Streptococcus mutans* convierte la glucosa en dextrano que forma la placa dentaria la que se fija a la superficie de los dientes junto a la bacteria *Actinomyces.*

Estas biopelículas o exopolisacáridos que producen esa formación mucosa, viscosa, resultan más preocupante cuando se forman al colonizar otras estructuras como catéteres, prótesis extensibles, lentes de contacto, alveolos,etc.

> **Es por ello que es mediante estas estructuras, biopelicula o slime que las bacterias sobreviven.**

El “slime” consiste entonces en una red de polisacáridos extracelulares (de material no organizado, difuso) involucrados en la adherencia, colonización y persistencia en ciertos biomateriales.

Staphylococcus spp., entre otros microorganismos, es un ejemplo de formador de “slime” cuando coloniza catéteres.

Tanto las cápsulas como el "slime" generalmente están compuestos por polisacáridos.

Otro ejemplo de bacterias que se protegen mediante la formación de biopelículas, es *Pseudomonas aeruginosa* asociada a la F.Q.

En este microorganismo, las moléculas que actúan como inductoras de la formación del biofilms se concentran rápidamente ante el aumento de la población y no quedan diluidas.

Esto ocurre debido a un mecanismo conocido como "quórum sensing" (control sensor de quórum o autoinducción). Por este mecanismo las bacterias determinan su propia densidad poblacional recurriendo a sensores o moléculas inductoras que detectan la misma hasta niveles elevados, suficientes para que la producción y liberación de sus enzimas no se diluyan ante escasas poblaciones.

El daño al huésped: la invasión- las toxinas

La invasión

Mediante la invasión la bacteria logra penetrar en el citoplasma de células no fagocíticas(endoteliales o epiteliales) y se multiplica dentro de ellas, se propaga a células adyacentes y las destruye luego. Cuando se trata de un patógeno intracelular se internaliza y se replica dentro de las células fagocíticas profesionales, como neutrófilos y macrófagos.

El éxito de un patógeno reside en producir el daño pero sin eliminar al huésped, ya que la eficiencia de la trasmisión disminuiría y no podrían entrar en contacto con nuevos huéspedes.

Existen situaciones donde la salud del huésped no es tan decisoria y la virulencia está en relación directa con la capacidad del patógeno de multiplicarse en forma amplia en el huésped y sobrevivir en el ambiente externo.

En el caso de *Mycobacterium tuberculosis*, agente de la tuberculosis y del *Corynebacterium diphteriare*, agente de la difteria, son bacterias que pueden sobrevivir muchos meses fuera del huésped humano.

Otras situaciones se dan en los patógenos que son propagados por el agua. Tal es el caso de *Vibrio cholerae*, agente del cólera o de *Shigella* spp., agente de la disentería bacilar. En estos casos la conducta o comportamiento de los huéspedes determinan la trasmisión del patógeno que al alcanzar las fuentes de agua se transforman en importante diseminación. El proveer de agua no contaminada reduce la trasmisión y por ello la virulencia.

La invasividad es la capacidad de ciertas bacterias para establecerse, reproducirse y diseminarse en los tejidos del hospedero.

La invasión es un proceso que se posibilita por la producción de sustancias extracelulares por el patógeno, las que actúan rompiendo la primera y/o segunda barrera de defensas del huésped.

Esas sustancias son proteínas, enzimas que actúan localmente dañando las células del huésped y/o facilitando su diseminación, lo que logran ya sea atacando la sustancia fundamental y las membranas basales de los tegumentos y láminas intestinales o degradando los complejos de hidratos de carbono-proteínas entre células o sobre la superficie celular, alterando la misma.

Ejemplo de algunas invasinas:

- hialuronidasa que ataca el tejido conectivo, posibilitando la diseminación de las bacterias que la producen como los estreptococos, estafilococos y clostridios.
- colagenasa producida por *Clostridium histolyticum* y *Clostridium perfringens* , entre otros, que destruye el colágeno, sostén de los músculos, facilitando la producción de la gangrena gaseosa.
- neuraminidasa la producen *Vibrio cholerae* y *Shigella dysenteriae*. Actúa sobre el cemento intracelular de las células epiteliales de la mucosa intestinal, el ácido neuramínico, llamado también ácido sialico, al que degradan.
- estreptoquinasa, producida por los estreptococos y estafiloquinasa producida por los estafilococos, encargadas de convertir el plasminógeno en plasmina, la que digiere los cóagulos de fibrina. Previene así la coagulación de la sangre y facilita la diseminación de la infección.
- fosfolipasa que hidroliza los fosfolípidos de la membrana celular, como la producida por *Clostridium perfringens*.
- lecitinasa, producida por *Clostridium perfringens*, destruye la lecitina de las membranas celulares.
- hemolisinas, que destruyen glóbulos rojos
- coagulasa, que al formar coágulos contribuye a la resistencia de la bacteria a la fagocitosis.

Las toxinas

La capacidad para producir toxinas, es aprovechada por muchas bacterias para producir enfermedad.

Interesan dos tipos de toxinas bacterianas

Las endotoxinas: lipopolisacárido (LPS),que forman parte integral de la pared celular. Las endotoxinas se encuentran solamente en bacilos y cocos gramnegativos: otros componentes de la pared como los LPS y los lipooligosacáridos (LOS). No son liberadas activamente de la célula y causan fiebre, shock y otras manifestaciones clínicas-

Están asociadas a la pared celular de las bacterias gramnegativas.

Las exotoxinas: proteínas extracelulares, son polipéptidos que son liberados por la célula bacteriana y pueden actuar a distancia, incluso remota, del sitio de crecimiento bacteriano.

Las características sobresalientes de las endotoxinas:

- químicamente se trata de un complejo de lipopolisacáridos.
- localizadas en la membrana externa de las bacterias gramnegativas
- codificadas por genes cromosómicos
- poco inmunogénicas
- termoestables
- toxicidad sólo a dosis elevadas
- tienen pirogenicidad
- asociadas a la endotoxicidad, shock séptico y bacteriemia por bacterias gramnegativas.

Las características sobresalientes de las exotoxinas:

- químicamente se trata de una proteína frecuentemente con dos componentes A y B
- son sustancias liberadas fuera de la célula bacteriana, durante su crecimiento.
- codificadas por genes cromosómicos ubicados en plásmidos o profagos que transportan los genes que las codifican.
- altamente inmunógenas y promueven la producción de anticuerpos neutralizantes o antitoxinas.
- pueden ser transformadas en toxoides.
- escasa o nula pirogenicidad
- llevan a menudo el nombre de la enfermedad que producen, ejemplo: toxina del tétano.
- producen enfermedades específicas y poseen mecanismos de acción específicos.
- alta toxicidad y alta letalidad.

Endotoxinas

La mayoría de las bacterias gramnegativas tienen un LPS en la membrana externa de su pared celular, el que, en algunas circunstancias, es tóxico para huéspedes específicos.

Este LPS es liberado ya sea por la lisis de la bacteria por algunos antimicrobianos que actúan sobre pared como los ß-lactámicos, o por la lisosima que es parte de las defensas del huésped.

Se sostiene que durante el ciclo de multiplicación bacteriana, se libera parte de la endotoxina.

Si bien la actividad biológica está asociada a todo el LPS, la toxicidad lo es al componente lipídico (el lípido A, la región más interna del LPS) y la inmunogenicidad al LPS.

Parte del mismo es el antígeno O.

El LPS gatilla la liberación de una serie de productos que conducen a la respuesta inflamatoria, responsable del mayor daño que pueden causar las bacterias gramnegativas, como la liberación de citoquinas de macrófagos y otras células.

También el LPS causa la liberación de sustancias vasoactivas, activación de la vía alternativa del complemento y activación del factor XII (factor Hageman), el primer paso en la cascada de la coagulación, lo que aporta a la coagulación intravascular diseminada (CID).

Todos estos efectos sobre la circulación, conducen a un colapso vascular, dañando principalmente el pulmón.

La inyección de bacterias gramnegativas vivas o muertas o de LPS purificado, produce una serie de reacciones como fiebre, leucopenia, seguida por leucocitosis, activación del complemento, hipotensión, mitogenicidad, inducción de la síntesis de prostaglandinas e hipotermia, eventos todos que pueden culminar en la sepsis o shock letal.

Muchas de estas respuestas del huésped, constituyen su mecanismo de defensa, siempre y cuando estas respuestas no sean exageradas.

Por ejemplo, la mitogenicidad sobre los linfocitos B, aumenta la resistencia contra la infección bacteriana y viral.

Como ocurren estos procesos:

La cascada de eventos que conducen a la sepsis, y/o shock, parecen desencadenarse a partir de la interacción del LPS con proteínas plasmáticas, formando un complejo llamado proteínas de unión al LPS.

Este complejo interactúa con receptores celulares de la superficie de granulocitos, macrófagos, plaquetas, linfocitos y otros tipos de receptores de células endoteliales, (los CD4).

Esta reacción desencadena una serie de eventos:

- producción de citoquinas como la interleuquina (IL) 6, 8 y otras como el FNT (asociado a la fiebre) y factor activador de plaquetas, todos eventos que conducen a la respuesta inflamatoria y shock séptico que acompañan a la toxemia endotóxica.
- activación del complemento, C3a y C5a, que conduce a la liberación de histamina y por ello a la vasodilatación.
- activación de la cascada de la coagulación, mediante la activación del factor XII, que conduce a coagulación, trombosis y CID, lo que disminuye plaquetas y varios factores de la coagulación, resultando posteriormente en hemorragia interna.
- liberación de péptidos vasoactivos que conducen a la hipotensión.

Estos sucesos: inflamación-CID-hemorragia y shock, como respuestas del huésped, exageradas y fuera de control, pueden resultar letales.

Se especula que este daño tisular producido por la respuesta celular del huésped a la endotoxina, es mayor que el producido por efecto directo de la toxina.

Exotoxinas

Basándose en el sitio específico afectado en el huésped, las exotoxinas pueden clasificarse en: neurotoxinas, citotoxinas y enterotoxinas.

Las neurotoxinas: afectan células del sistema nervioso, se ingieren generalmente como toxinas precursoras y en forma indirecta provocan síntomas entéricos.

Ejemplo de neurotoxinas: toxina botulínica, del tétano, enterotoxinas estafilocócicas y la toxina emética producida por *Bacillus cereus*,

- Toxina botulínica: actúa evitando la liberación de acetilcolina a nivel de la unión neuromuscular, conduciendo a la parálisis flácida.
- Toxina del tétano: actúa a nivel presináptico, por interferencia de la toxina en la liberación de un neurotrasmisor inhibitorio, la glicina, lo que conduce a la parálisis espástica.
- Toxinas estafilocócicas: si bien los síntomas de la intoxicación alimentaria por los estafilococos son gastrointestinales, los mismos son

atribuidos a la toxina que funciona además como un superantígeno, al actuar sobre el sistema nervioso autónomo central.

- Toxina emética producida por *Bacillus cereus*: actúa de modo semejante a la toxina estafilocócica.
- Las citotoxinas: afectan específicamente a determinadas células de tejidos de órganos especiales, de los cuales toman su denominación frecuentemente.

Ejemplo de citotoxinas: nefrotoxinas, cardiotoxinas.

Las de mayor interés: toxina de la difteria, producida por *Corynebacterium diphtheriae* y toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae*.

Las enterotoxinas: la acción sobre la mucosa intestinal es por un mecanismo directo con el resultado de una secreción líquida abundante.

Ejemplo de enterotoxinas: toxina del cólera (TC) y la toxina termolábil (LT) de *Escherichia coli* enterotoxigénico (ECET).

Desde el punto de vista de su estructura y actividad fisiológica, interesan las exotoxinas de tipo AB.

Toxinas tipo AB: se componen de dos subunidades, A y B.

La porción B que une al receptor de la célula del huésped, no es tóxica, y la porción A, enzimáticamente activa, es la parte responsable de la acción tóxica, pero carece de capacidad de unión al receptor.

Varios son los mecanismos propuestos para entender la entrada de la fracción A. Se postula como las rutas más probables a la endocitosis o la entrada mediante la producción de poros en la membrana.

En el caso del *Vibrio cholerae* y de ECET, la bacteria no invade, solo se adhiere a la mucosa intestinal y desde allí secreta la exotoxina.

El receptor para la porción B, es el, monosialosil gangliósido (GM1) de la célula intestinal.

A este receptor se une la toxina por su componente B que consiste en cinco subunidades que forman una estructura "en rosquilla", visible por microscopia electrónica.

La enterotoxina completa (el segmento A con sus dos trozos A1 y A2 y los cinco subunidades B), queda así unida a la superficie de las células epiteliales intestinales.

La porción A1-A2 es la que se internaliza y se subdivide en A1 y A2.

Es el segmento A1 el enzimáticamente activo que actuará sobre su proteína blanco.

La unión con este receptor dispara la señal para la activación de enzimas cíclicas, en especial la adenilciclasa ubicada en la membrana luminar

del enterocito, que induce, a través de una serie de transformaciones enzimáticas, la salida de agua y electrolitos.

Se propone que la entrada sea por un mecanismo de endocitosis y que una vez en las vesículas endosomales, A1 o bien es liberada al citoplasma o aún adherida al endosoma, se une a la proteína blanco Gs-alfa.

Otros investigadores proponen que la subunidad B, como consecuencia de la acción de la enterotoxina con la membrana celular, sufre cambios conformacionales más o menos profundos, que concluyen con la penetración de A1.

El aceptor de la porción A1 es el componente regulador G fijador de GTP de la adenilato ciclasa.

La proteína G pertenece a una familia de proteínas, que cumplen funciones regulatorias y que juntamente con la ciclasa son los dos componentes del complejo adenilato ciclasa.

Estas transformaciones enzimáticas se inician a partir de la acción de la toxina sobre la proteína G (fijadora de GTP) y que tiene dos estados configuracionales: cuando se une con el GTP estimula a la adenilato ciclasa para la elaboración de AMPc (3‘- 5’ adenosin monofosfato cíclico), mientras que cuando se une al GDP se inactiva.

Estos efectos duran poco en condiciones normales, dado que la proteína G es una GTPasa que cliva el GTP en GDP manteniendo un equilibrio en la función de la ciclasa, de lo que depende el equilibrio de secreción-absorción del intestino. De esta estimulación a la adenilato ciclasa resulta la elaboración de AMPc (adenosinmonofosfato cíclico), que bloquea la absorción de iones de sodio por las microvellosidades y estimula la secreción de iones cloruro y agua por las células de las criptas.

Este aumento en la pérdida de líquido y electrolitos se traduce en diarrea colérica, copiosa y acuosa.

Idéntico mecanismo ocurre en cólera.

Entre otras consecuencias, un exceso de AMPc inhibe la quimiotaxis y la fagocitosis, lo que atenta contra la capacidad de las células para destruir a los patógenos.

Este fenómeno adquiere suma importancia en la tos convulsa, producida por *Bordetella pertussis*, que elabora, entre otras, la toxina de la adenilato ciclasa (TAC). Esta toxina, mediante la ribosilación, conduce al aumento de AMPc que altera la movilidad de leucocitos para enfrentar al patógeno en esta enfermedad. En modelos animales se demostró que las cepas de *Bordetella pertussis* que no producen TAC, son avirulentas.

Los mecanismos de las exotoxinas A-B son sumamente complejos, como es el caso de la toxina de la difteria y de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa,* que tienen mecanismo de acción semejante.

La toxina, en el caso de la difteria, se une a los receptores específicos de las células susceptibles, por el fragmento B. El fragmento A es el activo.

Mediante la escisión proteolítica de la molécula ligada, el segmento activo A se interna en la célula.

Una vez allí, este fragmento A, que es una enzima, cataliza la inactivación de la translocasa del ARN de transferencia (ARNt) "factor de elongación 2" (EF2) eucariótico.

La pérdida de la translocasa impide que el ARN mensajero interactúe con el ARNt, por lo que no se agregan más aminoácidos a la síntesis de las cadenas polipeptídicas. Este EF2 modificado, no puede ya participar en el ciclo de elongación de la síntesis proteica, por lo que ocurre la muerte celular.

El EF2 se encuentra en las células eucarióticas pero no se encuentra en las bacterias.

A este mecanismo, el principal de la toxina diftérica, se agrega su capacidad citotóxica. La misma lleva a la lisis de las células por su actividad de nucleasa que conduce a la degradación cromosómica.

La toxina diftérica, de elevada potencia, afecta a todas las células del huésped y en forma más intensa a las del corazón (conduciendo a la miocarditis), a los nervios (llegando a la desmielinización) y riñones (produciendo necrosis tubular).

Las otras invasinas: muchas de las sustancias que vimos, que cumplen función de invasinas, son exotoxinas que desorganizan las membranas, de tal modo que lisan las células del huésped, mediante la ruptura de la integridad de la membrana plasmática.

Existen dos principales caminos por los que estas toxinas disgregan las membranas celulares.

Un camino: toxinas que disgregan la membrana celular, insertándose en la célula del huésped, formando poros o canales en la misma, por donde el contenido citoplasmático de la célula huésped sale y el agua entra, resultando en la lisis y muerte de ella. Usan este mecanismo:

- leucocidinas, que destruyen leucocitos, producidas por neumococos, estreptococos y estafilococos en su gran mayoría.
- hemolisinas, que destruyen glóbulos rojos, como la estreptolisina O producida por *Streptococcus pyogenes*, llamada también SLO.

La SLO se destruye por el oxígeno, y es la responsable de la hemólisis beta (hemólisis total) que produce *Streptococcus pyogenes* en las placas de agar sangre incubadas en anaerobiosis.

Otra hemolisina con semejante mecanismo para disgregar membranas, es la hemolisina S, producida también por *Streptococcus pyogenes*, llamada (SLS) que es estable frente al oxígeno, por lo que es la responsable de la hemólisis beta que produce en las placas de agar sangre incubadas en aerobiosis.

Un segundo camino: es desestabilizar la membrana celular de la célula huésped, causando su lisis y muerte mediante la hidrólisis de los fosfolípidos de la misma.

Ejemplo de ello son las fosfolipasas, (como la producida por *Clostridium prefringens*) que hidrolizan los fosfolípidos de la membrana celular.

En la gangrena gaseosa este papel lo cumple la toxina α (alfa) producida por este clostridio, que además causa destrucción masiva de leucocitos.

Los mecanismos de defensa del huésped

-defensas constitutivas son las llamadas también naturales o innatas, son inespecíficas como por ejemplo:

- la edad
- resistencia de especie
- el sexo
- la malnutrición
- el estado inmunitario del huésped.

-defensas inducibles llamadas así a las que ocurren por exposición a un patógeno.

Son específicas e involucran a la respuesta inmune, como son la:

- inmunidad activa, ya sea la que ocurre en forma natural luego de un proceso infeccioso o la artificial luego de la colocación de una vacuna
- Inmunidad pasiva lograda en forma natural trasmitida por el calostro o la lograda en forma artificial con los sueros hiperinmunes

Las estrategias de las bacterias para evadir las defensas del huésped

Si bien las estrategias son numerosas y algunas aún con sus mecanismos no cabalmente comprendidos, las comentamos agrupadas a continuación a los fines de su mayor comprensión.

> Estrategias contra la actividad del sistema del complemento (C)

Esta estrategia se basa en prevenir la activación del C, mediante:

- sustancias como la mureína de la pared de *Staphylococcus aureus* es eficaz para activar el C. Sin embargo la cápsula que la cubre, impìde esta activación, al enmascararla.
- anticuerpos anti IgA, que recubren a algunas bacterias como a meningococo cuando ingresa a sangre, impiden la activación del C.
- proteasas que producen la ruptura del factor del C, C5a, que impide la acción del mismo para atraer fagocitos. Ejemplo de ello es la producción de una proteasa por *Streptococcus pyogenes*.
- impedimento del acceso a la membrana bacteriana por el complejo de ataque de membrana, utilizando el polisacárido O como protector de superficie.

En *Salmonella* y *E. coli*, en las cepas lisas, se obstaculiza el acceso del complejo de ataque de membrana al sitio blanco (la membrana externa bacteriana) por la larga cadena del polisacárido del antígeno O que contienen. Sin embargo dicho mecanismo de destrucción funciona eficazmente en las mutantes rugosas, con nula o ningún antígeno O.

.Por ello las cepas lisas son más virulentas que las mutantes rugosas.

- *Neisseria gonorrhoeae* también genera resistencia al suero por este mecanismo, al modificar los lipooligosacáridos de su superficie a fin de interrumpir la formación del complejo de ataque de membrana durante la cascada del C.

Estas cepas son responsables de la gonococia diseminada, no así las cepas que no tienen resistencia al suero que se mantienen localizadas en el tracto genital.

- las cápsulas evitan la activación del C.

> Estrategias contra la actividad de los fagocitos

- varias enzimas interfieren la fagocitosis, como la coagulasa, las fosfatasas, las DNAsas, entre otras
- por inhibición de la motilidad de neutrófilos, como lo hace *Bordetella pertusis* con su toxina que aumenta los niveles de AMPc de los mismos, deprimiendo las funciones de la fagocitosis.
- por destrucción de neutrófilos y macrófagos, mediante la producción de leucocidinas, tal ocurre en *Staphylococcus aureus*.
- por escape a la fagocitosis, como lo hacen las bacterias que producen cápsula y algunas proteínas de superficie que interfieren la unión del fagocito a la célula bacteriana.
  Hemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae y Neisseria meningitidis son los típicos capsulados que evaden la fagocitosis valiéndose de su cápsula, como vimos antes.
  Streptococcus pyogenes, logra escapar del fagocito por su proteína M.
- por la capacidad de sobrevivir dentro de neutrófilos, monocitos y macrófagos. Esto lo logran ya sea escapando del fagosoma antes de su unión con el lisosoma, como ocurre en *Listeria monocytogenes, Shigella* y *Rickettsia,* o bien inhibiendo la fusión fagosoma lisosoma como ocurre en *Chlamydia* o resistiendo a la destrucción de las enzimas lisosomales, como lo hace *Mycobacterium tuberculosis*.

> Estrategias contra la respuesta inmunitaria específica

- la variación de fase en *Neisseria gonorrhoeae*, al variar genéticamente sus pilis que los hacen irreconocibles por los anticuerpos específicos.
- también aquí la producción de IgA proteasa por numerosas bacterias, posibilitan la evasión a estas respuestas inmunitarias del huésped.
- Idéntico logro alcanzan algunas proteínas como la A producida por los estafilococos y la G por los estreptococos del grupo A que se unen a la porción Fc de las inmunoglobulinas.

A modo de conclusión, solo agregar...

Numerosos estudios aun se realizan a fin de clarificar los diversos e intrincados mecanismos bacterianos involucrados en la patogenicidad.

Numerosos cambios en el proceso evolutivo ocurren en el ámbito de la relación huésped-patógeno.

Muchos de estos cambios, incluidos cambios en las funciones celulares, lo que impacta en la virulencia bacteriana, se deben a la selección resultante de la presión que los antimicrobianos producen sobre las bacterias.

Si no consideramos muchos de los mecanismos revisados anteriormente en este capítulo, como acción de toxinas, invasinas, adherencia, colonización, regulación ambiental, entre otros, no lograremos desentrañar la patogenicidad y por lo tanto poder defender al huésped de ella.

Bibliografía consultada

Alistair B Russell, S. Brook Peterson and Joseph D Mougous: "Type VI secretion system effectors; poisons with a purpose". En: *Nat Rev Microbiol*, Jan 2014; 12: 137-148 doi:101038/nrmicro318543.

Baron, S (Ed): *Medical Microbiology*. 4th Ed. The University of Texas. Medical Branch (UTMB). Disponible en: www.gsbs.utmb.edu.

Cárdenas-Perea M. E. *et al*: "Factores de virulencia bacteriana: la `inteligencia´ de las bacterias". En: *Elementos 94.* 2014.

Sanchez, Cesar: "Bacterial pathogenesis: The importance of first impressions". En: *Nat Rev Microbiol*, Published online 2011 doi:10 1038/nrmicro 2633

Comunicado de prensa 11. 06. 2009. "Un gran avance en la comprensión de la virulencia de la bacteria Listeria en el hombre". Instituto Pasteur – INRA – INSERM

José Molina López: *Factores de patogenicidad bacteriana*. Departamento Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina. México, UNAM, 2014.

Salyers A. A., Whitt D. D.: *Virulence Factors That Promote Colonization. Bacterial Pathogenesis a Molecular Approach*. American Society for Microbiology. Washington D. C., ASM press, 1994.

Vergara, Marta y cols.: *Las Infecciones Bacterianas y el Laboratorio de Bacteriología.* Posadas, EdUNaM. 2009.

CAPÍTULO 2
Infecciones en el Tracto Urinario (ITU)

Las bacterias y la virulencia ■ marta vergara

Una de las infecciones bacterianas más frecuentes en los seres humanos, en especial en el sexo femenino, es la infección del tracto urinario (ITU).

Puede afectar a las vías urinarias inferiores o a las inferiores y superiores.

Los factores de riesgo que están más frecuentemente asociados a la infección urinaria en la mujer, se relacionan con su estado hormonal.

Así como en la mujer fértil un factor de riesgo de destacar es el coito, en las menopáusicas es su estado hormonal por la ausencia de estrógenos. En el caso de las ancianas sometidas a cateterismo vesical, es éste una puerta de entrada de microorganismos.

La mayoría de las infecciones urinarias de la comunidad son producidas por una sola especie bacteriana y también la mayoría de estas infecciones son producidas por bacterias del ambiente colónico.

En el sexo masculino, son el coito anal, las infecciones por VIH y la falta de circuncisión, factores de riesgo.

De hecho que situaciones ajenas a estos riesgos, deben ser evaluadas, en especial la condición del paciente, ambulatorio o internado, como así también el tratamiento antimicrobiano recibido previamente.

Las bacterias

Es *E coli* la bacteria más involucrada como responsable de la ITU, en por lo menos, el 90% de los casos.

Otros microorganismos como *Proteus* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* y también levaduras son agentes etiológicos habituales.

En la mujer embarazada *Streptococcus agalactiae* (SGB) aparece frecuentemente como responsable del cuadro de una ITU.

Con menor frecuencia aparece *Staphylococcus saprophyticcus* y *Pseudomonas* spp.

Las vías urinarias son normalmente estériles, a excepción de la uretra anterior en el sexo masculino y en la mujer probablemente la totalidad de la uretra.

Se sugiere, por cultivos, que la población bacteriana de la uretra anterior está habitada por *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* y algunos estreptococos alfa hemolíticos, no cuantitativamente importantes.

Otras bacterias como *Escherichia coli*, *Proteus* spp. y corinebacterias, que son probablemente contaminantes de piel, vulva o recto, pueden ocasionalmente ser encontradas en la uretra anterior.

Algunas especies de los géneros *Klebsiellas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas, Proteus, Acinetobacter, Stafilococcus* y *Enterococcus* se recuperan en los casos de infecciones recurrentes o en pacientes con diversas anomalías estructurales o inmunosupresión. Es en estas situaciones, como también ante uso indiscriminado de antimicrobianos, donde un hallazgo de laboratorio correctamente estudiado, tiene importancia.

En general, la gran mayoría de las infecciones urinarias son monomicrobianas (más del 95 %) y de éstas más del 90 % son causadas por bacilos gramnegativos, es especial *Escherichia coli*, que predomina en los episodios iniciales en todas las edades.

Escherichia coli

La infección del tracto urinario es una de las formas más comunes de infecciones extraintestinales producidas por esta bacteria, que pertenece a la familia de las *Enterobacteriaceae*, familia que tienen en común entre las propiedades más sobresalientes-: una estructura celular, pared, membrana externa con el lipopolisacárido (LPS) y su endotoxina, membrana citoplasmática con sus proteínas fijadoras de ß-lactámicos y que le permite regular

el paso de sus nutrientes y todas las sustancias necesarias para su metabolismo y energía, flagelos que le dan movilidad y fimbrias (que sobresalen como apéndices filiformes) con función de intercambio genético y de adhesión a receptores del huésped que determinarán acciones en la patogenia y en la respuesta a los tratamientos antimicrobianos. (**Capítulo 1**)

Otras propiedades comunes como : atacar fermentativamente los hidratos de carbono y en general todos fermentan la glucosa con producción de ácido y no producen oxidasa.

Además de habitar el tracto gastrointestinal como colonizantes, hay cepas responsables de diversas enfermedades aún extraintestinales, como neumonía, colecistitis, colangitis, peritonitis, bacteriemia, sepsis, celulitis, osteomielitis, meningitis neonatal, sepsis neonatal y artritis infecciosa, entre otras.

E. coli es un bacilo gramnegativo móvil o inmóvil, que se presenta aislado o en pares, en forma de bastón, de 1-2 μm de largo y 0,5 μm de diámetro.

El aspecto mucoide en las colonias de algunos miembros de esta familia está dado por un abundante material capsular como es el caso en *Klebsiella* y *Enterobacter*.

Las cápsulas, además de ocultar al antígeno O a los anticuerpos aglutinantes (en una reacción sensible al calor) debido a su variación de la estructura química, posibilitan la serotipificación K de los microorganismos y tienen otras propiedades en algunos casos, como la de resistir la acción bactericida del suero y evitar la fagocitosis.

El antígeno K de *E. coli* es un mucopolisacárido acídico constituyente del glicocalix, capa mucoide de la parte externa de la bacteria.

Se conocen más de 80 tipos de antígeno K en *E. coli*.

Como vimos en el **Capítulo 1**, la producción de toxinas que disgregan membranas, constituyen otro importante factor de virulencia, aunque no reproducen la enfermedad, como es el caso de la hemolisina. No ocurre ésto con la endotoxina o lípido A, el principal factor de virulencia.

También estas cepas tienen el "sistema de secreción tipo III" para el daño, como así también el desarrollo de sideróforos, la aerobactina, para la adquisición de hierro **(Capítulo 1).**

Proteus spp.

Otro uropatógeno, de la familia *Enterobacteriaceae*, bacilo gramnegativo aerobio ampliamente distribuido en la naturaleza y un aerobio facultativo de la población bacteriana fecal de humanos.

Se diferencian de los otros bacilos enterobacterianos típicos, al expresar fimbrias y flagelos para dar bastones muy alargados con miles de flagelos que translocan con rapidez a través de la superficie de placas de agar, como veremos más adelante.

El nombre de proteus se tomó de un personaje de la Odisea de Homero, que era capaz de cambiar de forma.

Existen varias especies de *Proteus*.

Las especies *mirabilis* y *vulgaris* representan la mayoría de los aislados clínicos involucrados en infecciones. Ambos producen ureasa pero *vulgaris* es indol positivo.

Otra característica de este género es la producción de SH_2.

Los *Proteus* spp., son causas comunes de ITU de modo ocasional en huéspedes sanos y con mucha frecuencia en aquellos con catéteres insertados o anomalías anatómicas o funcionales del tracto urinario.

Las ITU causadas por *Proteus* spp., tienden a ser más graves que las producidas por *E. coli,* con una proporción superior que representa pielonefritis y frecuentemente son aislados del torrente sanguíneo, llegando a ser la segunda causa de bacteriemia a partir de una infección urinaria, precedido sólo por *E. coli*.

P. mirabilis ocupa el segundo lugar en frecuencia en la ITU en pediatría y no es frecuente recuperarlo en la bacteriuria asintomática(BA).

En general, *Proteus* spp., son causa de ITU en huéspedes sanos algunas veces y frecuentemente en pacientes hospitalizados, con catéteres insertados o con complicaciones del tracto urinario, ya sea por anomalías anatómicas o funcionales.

Su habilidad invasora y de daño al huésped está sustentada por:

- la gran movilidad que le confieren sus flagelos perítricos
- la capacidad de expresar adhesinas, fimbrias/pilis (MS) y (MR- P)
- la producción de:- hemolisina, formadora de poros, tóxica, que daña las membranas celulares. - de polisacárido capsular, que le facilita la invasión en el huésped.- de IgA proteasa, que degrada anticuerpos de la defensa local. - de ureasa que contribuye a la colonización y a la formación de piedras.-de sideróforos para el rescate del hierro.
- la habilidad de formar biofilms**(Capitulo 1)**.

A pesar de ello, tiene limitada su supervivencia en la orina a la que alcaliniza por la acción hidrolítica de la ureasa sobre la urea.

Esta acción de la ureasa, genera subproductos que resultan tóxicos a ciertas concentraciones, como amoníaco y CO2, lo que conduce a la precipitación de estruvita, formación de cálculos e incluso a obstrucciones de catéteres urinarios. Los cálculos del riñón sirven de cuerpos extraños a los que se integran las bacterias y desde donde se diseminan y producen infecciones recurrentes. Estos cálculos, sales de fosfato amónico magnesio, por ejemplo, al causar obstrucción de las vías, también interfiere con el vaciado de la orina dificultando la eliminación de microorganismos de dichas vías.

La producción de ureasa, con la consecuente elevación del pH urinario, incrementa la magnitud del daño.

Además de la producción de ureasa, la presencia de flagelos son importantes factores de virulencia asociados con infección urinaria en *Proteus mirabilis*. Da cuenta de ello, la imposibilidad de producir infección urinaria, con mutantes inmóviles de esta especie, aún inoculando intravesicalmente importante inóculo. Los flagelos son estructuras compuestas por múltiples y diferentes subunidades de flagelina.

P. mirabilis es un microorganismo dimorfo, capaz de diferenciarse desde una única célula en forma de bastón (célula "swimmer") a células múltiples elongadas (célula "swarmer"). Una de las características más sobresalientes de las células "swarmer" es la sobreproducción de flagelos.

Se postula que la habilidad de *P. mirabilis* para colonizar la superficie de los catéteres, y del tracto urinario, reside en la propiedad de "swarming."

A diferencia del comportamiento "swimmer", que se da en medios líquidos, las células "swarmer" se mueven sobre la superficie del medio de agar sangre, por ejemplo desarrollando y avanzando progresivamente en forma concéntrica, como "olas seriadas" (swarmer) lo que dificulta el aislamiento de otros microorganismos que pudieran estar presentes.

Una vez establecido en el área periuretral, *P. mirabilis* puede pasar a través de la uretra y alcanzar la vejiga.

En las células "swimmer" los flagelos juegan un rol importante en permitir a la bacteria moverse vigorosamente desde la uretra al tejido blanco en la vejiga.

La elongación y la sobreproducción de flagelos en las células "swarmer" hacen posible la ruta ascendente de esta bacteria.

Se ha detectado, en modelos animales, que cepas con movilidad, pero no "swarming" o mutantes defectuosas de "swarming", fueron incapaces

de infectar el riñón. Es decir, una disminución de la virulencia en mutantes defectivos en "swarming".

Esto da cuenta de la importancia de las células "swarming" en las ITU ascendentes y en la pielonefritis. La propiedad de "swarming" depende de un complejo proceso regulado genéticamente.

Complejos procesos se observan en estos dos estados de las células, desde diferencias en el LPS, en el metabolismo y en la actividad respiratoria.

Una vez alcanzada la vejiga, *P. mirabilis* produce un número de fimbrias y adhesinas que unen específicamente a la superficie de la mucosa del tracto urinario incluyendo las células epiteliales de la vejiga.

El tratamiento de las infecciones causadas por *P. mirabilis* suele ser sencillo, pues la mayoría son susceptibles a los antibióticos utilizados comúnmente.

Proteus spp., presenta a veces resistencia a varios antimicrobianos y las cepas de *P. vulgaris* más aún.

Klebsiella spp.

Son cinco las especies asociadas a enfermedad en humanos: *Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca , Klebsiella ozaenae, Klebsiella ornithinolytica y Klebsiella rhinoscleromatis.*

Klebsiella pneumoniae: la mayoría de estas cepas producen colonias mucoides, de consistencia viscosa, debido a la exuberancia de su cápsula polisacárida.

Todas las especies son inmóviles.

También estas bacterias expresan adhesinas (MS) y (MR) capaces de reconocer receptores en células uroepiteliales, a los que se adhieren, escapando así a la respuesta inmune del huésped.

En este microorganismo, la producción de ureasa, en menor proporción que en *Proteus mirabilis*, conduce a la secuencia de efectos patogénicos que vimos anteriormente.

El LPS confiere, por su antígeno O, una marcada resistencia al poder bactericida del suero.

La producción de exopolisacáridos capsulares se constituye en importante factor en la virulencia en estas cepas.

La cápsula, que es antigénica y determina más de 70 serovariedades, tiene diversas propiedades:

- por la exuberancia en su producción en esta especie, es la responsable de la formación de colonias mucoides durante su desarrollo.
- resiste la acción bactericida del suero
- evita la fagocitosis, promoviendo la virulencia.
- está involucrada en la colonización del tracto urinario, paso fundamental para las ITU.

Por lo dicho, cápsula, fimbrias, resistencia al poder bactericida del suero, actividad de ureasa y el LPS, son las principales factores de virulencia de *K. pneumoniae*.

Son además responsables de la resistencia bacteriana hospitalaria de elevada diseminación. La resistencia a la ampicilina, codificada por un gen cromosómico, se presenta en todas las especies de *K. pneumoniae*.

Además, la resistencia a numerosos antimicrobianos, en especial en las cepas de origen nosocomial, es debida a la adquisición de plásmidos que codifican resistencias múltiples, como los plásmidos que codifican β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) que inhabilitan el uso de la mayoría de las cefalosporinas, o las cepas portadoras de plásmidos que confieren resistencia a los carbapenemes, las KPC, reduciendo sensiblemente las opciones terapéuticas, como ocurre también en cepas de *E. coli* y *P. mirabilis*.

Las especies de *Klebsiella* producen infecciones urinarias y extraintestinales.

Es en el ambiente hospitalario donde está involucrada en la mayoría de las infecciones, de heridas, neumonía, ITU, bacteriemia, sepsis, infecciones de dispositivos intravasculares, de prótesis, de vías biliares, peritonitis, meningitis, entre las más frecuentes.

Bacterias grampositivas

Son los estafilococos y los enterococos, de las bacterias grampositivas, las que participan como agentes etiológicos de las ITU con frecuencia cada vez en aumento, tanto en sondados como en no sondados.

Enterococcus spp.

Los enterococos son cocos grampositivos, que se encuentran aislados, de a pares, o formando cadenas cortas.

Los enterococos pertenecían a los *Streptococcus* grupo D de Lancefield. Recién a mediados de la década del 80, se clasificaron en su propio género.

Son bacterias catalasa negativa, anaerobias facultativos, capaces de crecer en condiciones un tanto extremas, como la habilidad de crecer en presencia de NaCl al 6,5%, a temperaturas entre 10°C y 45°C, y hasta en un pH de 9,6.

La hidrólisis de la esculina, el desarrollo en medios con bilis y la reacción de la -pirrolidonil ß-naftil-amida (PYR), positiva son características de esta bacteria.

Las especies de enterococos clínicamente importantes son: *E faecalis, E faecium, E durans, E avium, E gallinarum, E casseliflavus, E raffinosus, E malodoratus, E hirae, E mundtii, E solitarius, E pseudoavium*.

E faecalis es el patógeno humano más frecuente representando el 60% al 90% de los aislamientos clínicos de enterococos. *E faecium* es la segunda especie aislada en frecuencia, representando el 5% al 16% de los aislamientos clínicos.

Es una bacteria que tiene su reservorio en los humanos. Particularmente *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, forman parte del contenido bacteriano normal del tracto gastrointestinal tanto en el hombre como en los animales y en las mujeres en el tracto genitourinario

E faecalis se encuentra en el 80% de los pacientes hospitalizados, y *E faecium* es recuperado en el 30%.

El 60% de los hombres en el hospital son portadores de enterococo en el área perineal y en el meato urinario.

En la última década, estos organismos han adquirido cada vez más importancia como patógenos nosocomiales, a pesar de su baja virulencia.

El género *Enterococcus* tiene ciertas características que les facilita la diseminación entre los pacientes hospitalizados:

Los enterococos son parte de la población microbiana normal endógena humana, y tienen poco potencial patogénico en el huésped normal. Sin embargo, en el anciano o en el paciente inmunocomprometido, estos organismos se vuelven patógenos oportunistas. Las infecciones ocurren cuan-

do las defensas del huésped descienden por una enfermedad y por el uso de dispositivos invasivos. Se conoce muy poco acerca de los factores de virulencia de los enterococos. La presencia de hemolisinas o la agregación de sustancias fueron postuladas como factores de virulencia. Adicionalmente, los carbohidratos de la pared celular o los sitios de unión de la fibronectina que favorecen la adherencia a los tejidos del huésped, pueden incrementar la patogenicidad.

Este microorganismo sobrevive en las superficies del medio ambiente; y se han aislado organismos resistentes del medio ambiente que rodea a los pacientes infectados, incluyendo los termómetros electrónicos, el mango para tomar la presión, batas y ropa de cama de los pacientes, barandas de la cama, la mesa de luz, y el piso.

Los trabajadores de la salud también pueden colonizarse con cepas de enterococo resistentes, aislándoselo de las manos o el tracto gastrointestinal en el curso de una investigación durante un brote epidémico.

Los enterococos son resistentes a varios antibacterianos de uso frecuente, hecho éste que les facilita su permanencia en el hospital, donde puede permanecer por largos periodos de tiempo.

Los enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) pueden colonizar todos los sitios ya mencionados para este género. La colonización rectal por parte de estos microorganismos fue encontrada en el 100% de los pacientes con bacteriemia debida a ERV. Los ERV pueden colonizar la piel del 86% de los pacientes con bacteriemia a ERV. La colonización persistente del tracto gastrointestinal es el impacto clínico más común de los ERV. La colonización es un precursor de la infección en pacientes vulnerables, y se correlaciona con un mal resultado.

No obstante su baja virulencia es en esta última década que han adquirido importancia como patógenos nosocomiales fundamentalmente por:

- su capacidad de sobrevivir por largos periodos en condiciones adversas en el medio ambiente
- su capacidad de trasmitirse en el hospital a través del personal de salud y equipos contaminados
- su resistencia intrínseca a muchos antimicrobianos.

Generalmente el enterococo se contagia por contacto directo con las manos, superficies ambientales o equipos médicos contaminados con heces de personas infectadas.

La colonización del tracto gastrointestinal por EVR es típicamente de larga duración, en algunos casos pueden persistir por años.

Las medidas de prevención más importantes con los internados, que deben ser extendidas a familiares:

- usar camisolín y guantes
- evitar ingresar papeles u objetos en general a la habitación del paciente
- usar lavado con antisépticos o usar geles alcohólicos para manos termómetros y otros objetos antes de abandonar la habitación.

Las manifestaciones clínicas de ITU causada por enterococos no pueden distinguirse de aquellas causadas por otros microorganismos.

La causa de mortalidad por ITU debida a enterococo, en ausencia de bacteriemia es baja. A pesar de la baja morbilidad y mortalidad asociada a ellas, las ITU por enterococo tienen un aumento en la estadía y en los costos de hospitalización.

Staphylococcus spp.

Los estafilococos serán revisados en detalle en el **Capítulo 5**.

Los estafilococos son microorganismos grampositivos, células esféricas de 0,5 a 2,5 µm de diámetro que se dividen generalmente en más de un plano, formando racimos irregulares o paquetes.

Utilizan carbohidratos y/o aminoácidos como fuentes de carbono o energía En general no tienen exigencias nutricionales y crecen bien en medios simples del laboratorio.

Son aerobios y anaerobios facultativos, no tienen esporas y son inmóviles y producen, entre una gran variedad de sustancias, la enzima catalasa que se usa para la identificación.

Staphylococcus aureus produce colonias circulares, cremosas con pigmento amarillo que da el característico color a las colonias.

Son muy resistentes a las condiciones adversas y se mantienen viables durante mucho tiempo en los cultivos.

Staphylococcus coagulasa negativa (*S. epidermidis* y *S. saprophyticus)* son las especies importantes en las ITU en el sexo femenino. En el sexo masculino estos microorganismos están más asociados a obstrucciones u otra anormalidad.

La especie *saprophyticus* causa infecciones del tracto urinario especialmente en mujeres jóvenes ambulatorias, estando involucrada en segundo lugar como agente etiológico y en el sexo masculino en la uretritis. Situaciones éstas que lo logra mediante sus adhesinas superficiales para iniciar el ascenso.

Es una bacteria muy sensible a los antimicrobianos con excepción de la novobiocina y la fosfomicina, resistencia que junto a la nula actividad coagulasa se utilizan para su identificación en el laboratorio.

Además de la adhesión, la producción de "slime" y de ureasa, contribuyen a la patogenia en pacientes vulnerables como, portadores de sondas o cateterizados permanentes o con obstrucciones de las vías.

La presencia de *S. aureus* y *S. epidermidis* en estos pacientes se debe a sus adhesinas que pueden adherirse a superficies, incluso, de materiales inertes.

La mayor importancia de los estafilococos coagulasa negativa reside en su habilidad para colonizar dispositivos artificiales como catéteres intravasculares, o del tracto urinario o prótesis mediante la producción de "slime".

Esta habilidad de producir este biofilm sobre la superficie de dispositivos protésicos es probablemente, determinante en la virulencia de muchas bacterias ya que:

- protege a las bacterias de la acción de los mecanismos de defensa del huésped y de la llegada de antimicrobianos, como vimos anteriormente, con lo que favorece la adherencia bacteriana

S. aureus, es infrecuente su participación en infecciones del tracto urinario en los pacientes ambulatorios, a pesar de las numerosas infecciones en diferentes localizaciones que sí produce.

Es de destacar que, las cepas meticilino resistentes (portadoras del gen *mecA* responsable de la resistencia a los antibióticos ß-lactámicos y relacionados) causan importantes infecciones o contaminaciones del tracto urinario en pacientes hospitalizados.

Trabajando con cepas de *S. epidermidis* se ha observado que su adhesión a células vesicales es más intensa en las cepas capsuladas que en las no capsuladas, aunque sean productoras de biofilm, lo que sugiere una especialización para optimizar la adherencia necesaria para iniciar el daño.

Además de *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* (un patógeno oportunista en alrededor del 35% de las ITU adquiridas en el hospital), otras bacterias como *Staphylococcus* coagulasa negativa y *Ente-*

rococcus spp. se asocian además a anormalidades anatómicas o fisiológicas del tracto urinario.

Otras de aparición menos frecuente como *Corynebacterium urealyticum* (antes D2) se recuperan de pacientes con cistitis incrustante y cálculos de estruvita. La presencia de hematuria y un pH muy elevado, son elementos de sospecha de su presencia.

Gardnerella vaginalis es frecuentemente aislada en la orina de mujeres embarazadas con y sin síntomas en el tracto urinario, aún sin conocerse claramente su importancia en esta patogenia. Para su reconocimiento como agente etiológico, requiere su aislamiento en dos muestras de orina sucesivas o bien mediante punción suprapúbica.

Idénticas precauciones son requeridas cuando se recupera anaerobios, los que si bien son excepcionales, se pueden aislar en pacientes inmunocomprometidos, con tumores vesicales, muy instrumentados, o con fístulas vesico-rectales.

Ureaplasma urealyticum y Mycoplasma hominis son a veces asociados a pielonefritis y uretritis.

El camino al Daño

Es prioritario recordar que en condiciones normales la orina y las vías urinarias son estériles.

El camino a la ITU se inicia con la colonización de la uretra distal y el vestíbulo vaginal por los microorganismos patógenos, microorganismos éstos que provienen del tracto gastrointestinal, favorecidos en la invasión de las vías urinarias por la proximidad de la uretra al ano en la mujer.

En el varón se asocian dos situaciones que evitan el ascenso de los microorganismos hacia la vejiga como las secreciones prostáticas de propiedades bactericidas y una mayor longitud de la uretra lo que la distancia del ano.

En ambos sexos, las bacterias primero colonizan la zona perineal, alcanzando luego el meato uretral y la uretra.

Este camino de los microorganismos que ascienden desde la uretra y tejidos periuretrales a la vejiga, ocasionando la cistitis o bien llegando hasta el riñon ocasionando la pielonefritis, es el mecanismo habitual en la producción de una ITU.

Ya sea por la acidez vaginal en la mujer fértil o por el déficit de estrógenos en la post- menopausia, la vagina funciona como un excelente reservorio de cepas potencialmente involucradas en las ITU.

Esta comprobación adquiere relevancia a la hora de decidir la elección del antimicrobiano para uso profiláctico o terapéutico, el que debe tener buena concentración vaginal.

Los niños circuncidados, son más resistentes a las infecciones que los incircuncisos, dado que el prepucio, al dificultar su adecuada limpieza, facilita su colonización.

Una excepcional vía ascendente puede producirse en diversos tipos de exploraciones urológicas, siempre producidas por causas iatrogénicas.

Las bacterias pueden acceder al tracto urinario para producir el daño, ya sea por:

- la vía ascendente- la vía linfática-la vía hematógena
- la vía hematógena: es la menos frecuente. Cuando ello ocurre se trata de bacteriemias que pueden producir abscesos renales.

Son las enterobacterias las que principalmente colonizan el introito vaginal y la zona periuretral en las mujeres y el prepucio en los varones.

Las infecciones por *E. coli* se producen por la vía ascendente, casi absolutamente.

En la mayoría de las situaciones estas bacterias se eliminan por el flujo vaginal o por las propiedades antibacterianas de la orina o sea es la misma orina la encargada de eliminarlas. También puede actuar en esta eliminación la IgA secretora de la superficie vesical.

Si las bacterias no son eliminadas se inicia la fase de colonización, luego lesión del epitelio vesical, lesión inflamatoria y el camino al daño tisular produciendo la cistitis.

Si no ocurre la lesión inflamatoria, la colonización es asintomática o sea estamos ante una BA.

De todos modos muy pocos episodios son los que tienen una etiología exógena, o sea son producidos por microorganismos ambientales que llegaron a las vías urinarias durante la manipulación de éstas.

Es importante recordar que:

- la presencia de hifas o pseudohifas en el glomérulo está fuertemente asociada a la diseminación hematógena de este microorganismo.
- la presencia de *Staphylococcus aureus*, en forma reiterada, en una muestra de urocultivo bien recolectada, está indicando la necesidad

de la búsqueda de un foco óseo, prostático o de endocarditis o ántrax, entre otros.
- una infección urinaria en el recién nacido, debe pensarse en la vía descendente y que puede ser consecuencia de una bacteriemia, en especial por gramnegativos.
- la pielonefritis tuberculosa es la consecuencia de una diseminación hematógena.

Las ITU son la resultante de una serie de interacciones que ocurren entre la virulencia de los uropatógenos, factores biológicos, estado inmune y mecanismos de defensa del huésped.

Como vimos antes, si las bacterias no pueden ser eliminadas se inicia la colonización con adhesión al uroepitelio (que involucra receptores en las células del huésped y las adhesinas de las bacterias) y lesión del epitelio vesical, proceso que dependerá de los mecanismos puestos en juego (**Capítulo 1**)

Para que la colonización sea exitosa un prerrequisito es la persistencia y la infección de la vejiga.

Entre las enterobacterias tomaremos como modelo de estudio, *Escherichia coli.*

La adherencia va a seleccionar las bacterias capaces de colonizar el colon y alcanzar y colonizar el tracto urinario normal, logrando este objetivo las que poseen mejor nivel de adherencia a las células vaginales y periuretrales pudiendo colonizar el orificio uretral y alcanzar sitios más lejanos.

La capacidad de adherir, producir inflamación, invadir y desarrollar una ITU está determinada por diversos factores de virulencia que la bacteria pone en juego. Varios de estos factores están codificados por genes que se encuentran en las "islas de patogenicidad" (**Capitulo 1**) y no se encuentran en los coliformes que constituyen la microbiota fecal normal

Adhesinas tipo 1 o MS (fimbrias llamadas "manosa sensible") que se unen a receptores del huésped que contienen manosa de glucoproteínas secretadas en el tracto urinario, unión que se inhibe por agregado de manosa, desempeñan la función primordial en la adherencia al uroepitelio. Entre estas proteínas, la unión a la inmunoglobulina A secretora (IgA) y a la proteína de Tamm-Horsfall (PTH) es de relevancia en el destino de estos uropatógenos.

Las fimbrias MS serían removidas de la orina vesical por la PTH, que se produce en las células apicales de la porción ascendente del asa de Henle y del túbulo contorneado distal, colaborando con las defensas antibacte-

rianas, al impedir que *E. coli* MS se una a los receptores de las células epiteliales. Otras cepas tienen como receptores a células epiteliales que contienen glucoesfingolípidos (componentes del glicocalix que rodea las células epiteliales) y son las responsables de las infecciones en el riñón. Esta unión que no se inhibe con la manosa, se llama manosa resistente (MR) (resisten a la inhibición) (**Capítulo 1**) y son las cepas que ascienden ya que no son retenidas por el mucus ni fácilmente fagocitadas.

Los niveles disminuídos de PTH en los ancianos explican en parte la frecuencia elevada de las ITU.

Casi todas las cepas de *E. coli* que producen cistitis expresan fimbria, MS.

Se especula que los *E.coli* con fimbrias MS, opsonizados por los anticuerpos, eliminan sus fimbrias al alcanzar la pelvis renal, ya que el gen que las codifica promueve la adherencia a los fagocitos.

Dentro del fagocito, la bacteria ya atenuada, sobrevive protegida de los antimicrobianos y al emerger después, puede ser responsable de la recaída en la bacteriuria.

Las fimbrias, que se expresan en la fase estacionaria, favorecen la adhesión pero también la fagocitosis no inmune de las cepas que las expresan.

Por las micciones frecuentes, la multiplicación bacteriana es logarítmica en la infección aguda, lo que lleva a que las cepas sean no fimbriadas y por lo tanto, menos propensas a la fagocitosis no inmune.

Se especula que la internalización y la acción citotóxica es más rápida en la bacteria fimbriada que en la afimbriada. Este hecho explica que las bacterias afimbriadas sean colonizantes y las que poseen fimbrias sean colonizantes e invasores.

Los genes que codifican la expresión de las fimbrias en *E. coli* uropatógenos, están ubicados en los cromosomas, a diferencia de *E coli* enterotoxigénica (ECET), productora de "la diarrea del viajero", que se codifican plasmídicamente.

La formación de slime o biofilms creadas por bacterias en el interior de las células epiteliales de la vejiga, que han invadido y la liberación de toxinas como la hemolisina, invasinas completan el camino al daño. (**Capítulo 1**).

Se ha demostrado que cepas de *E coli* que causan pielonefritis son más adherentes que las que causan cistitis y las que se recuperan de las vías urinarias son más adherentes que las de heces.

Algunas fimbrias MR llamadas P(por receptores análogos al grupo sanguíneo P, en los eritrocitos humanos) con su unidad principal Pap (pili asociado a la pielonefritis) en *E. coli,* tiene sus receptores en el epitelio tubular y actúan a nivel pélvico y tubular facilitando la adherencia y permanencia de las cepas que lograron ascender.

Cepas con fimbrias P tienen persistencia en el árbol urinario, facilitando la respuesta inflamatoria y permaneciendo en los pacientes con pielonefritis aguda, especialmente en niños y mujeres que no presentan trastornos del tracto urinario. Además estas fimbrias pueden ocasionar urosepsis, al permanecer tiempos mayores en el intestino desde donde ascienden al tracto urinario, a pesar de ser resistentes a la fagocitosis por neutrófilos, estimulan la liberación de citocinas proinflamatorias.

Mediante la adhesión la bacteria logra: Iniciar la fase de invasión, multiplicación y lesión.

Para ello las bacterias deben reproducirse a tiempos acelerados y la obtención de hierro es fundamental para lograr ese objetivo. La producción de la hemolisina, al actuar como citotoxina, posibilita a la bacteria disponer de hierro para su viabilidad, que libera de la hemoglobina.

La velocidad de crecimiento y en especial de *E. coli*, supera ampliamente los intervalos miccionales, con lo que se asegura de no ser expulsado por arrastre, minimizando las defensas del huésped.

Secundariamente, una vez adheridas al uroepitelio, las cepas que son capaces de producir hemolisinas y endotoxinas, aumentan la invasión tisular y el daño celular.

La fase de invasión multiplicación se ve favorecida además por la producción de enzimas como ureasa, para obtener energía y accionar toxicamente, y de IgA-proteasa para anular las defensas a cargo de las inmunoglobulinas A secretadas en el tracto urinario.

La fase de lesión la llevan a cabo por, además de fimbrias, hemolisinas y leucocidinas, por la producción de un factor citotóxico necrotizante, que conduce a la desnaturalización, colapso, muerte celular y descamación.

Este factor citotóxico, puede producir secuelas como micro-ulceraciones del urotelio anulando otras defensas del tracto urinario, ante la invasión bacteriana.

La posesión del LPS y su endotoxina aumenta la capacidad de invasión tisular y daño celular, comentado anteriormente.

La reacción inflamatoria resultante daña la funcionalidad de los esfínteres vesicales o ureterales favoreciendo el ascenso de microorganismos.

Pareciera que existen determinados serovares que se comportan como nefropatógenos, siendo de utilidad su determinación en la diferenciación de persistencia o reinfección.

Otro mecanismo que poseen algunas cepas uropatógenas, es la presencia de antígenos capsulares que da protección contra la lisis mediada por complemento y la fagocitosis.

Es importante recordar que las cepas capsuladas tienden a persistir.

La cápsula da, a las cepas que la poseen, gran resistencia a los antimicrobianos y a la fagocitosis, al formar una matriz protectora, cargada intensamente con carga electronegativa por lo que puede rechazar las moléculas polares de los mismos, imposibilitando también la llegada de fagocitos y favoreciendo la adhesividad a las células renales.

De la gran cantidad de antígenos capsulares identificados en *E. coli*, sólo K1, K5 y K12 se asocian a infecciones urinarias. De ellos el K1 es considerado el mayor factor de virulencia (gran resistencia al poder bactericida del suero) relacionado a bacteriemias en adultos y meningitis neonatal por *E. coli.*

Ciertos serotipos O, K y H se asocian a la urovirulencia, gravedad e infecciones altas complicadas como la pielonefritis, como así también se asocian a la expresión de varios determinantes de factores de virulencia.

La selección de estos serotipos se haría en el intestino, selección basada en los factores de virulencia que le faciliten adhesión, ascenso en el tracto urinario y capacidad de desencadenar la enfermedad.

Estos mecanismos son fundamentales en la patogenia de las ITU aún en pacientes que no poseen algún tipo de alteración estructural ni funcional de las vías urinarias.

La presencia de cuerpos extraños, cálculos o anormalidades estructurales de las vías urinarias, constituyen un excelente albergue que resguarda a los microorganismos de su erradicación, pero en los niños, en especial, el reflujo vesico-ureteral favorece el ascenso de los mismos al riñón, produciendo ITU altas.

Dado que el tracto urinario es llenado con orina en pocas horas, los microorganismos tienen problemas para ganar el acceso y comenzar a establecerse, de allí que la conservación de la esterilidad es fundamental para evitar las ITU, y el vaciamiento del contenido vesical se destaca en este proceso por su efecto protector importante.

Numerosas causas están involucradas en impedimentos para lograr un adecuado pasaje de la orina, como las asociadas a cicatrices renales, mal-

formaciones, (embarazo por su capacidad de excreción modificada), cálculos, sondas, etcétera.

Además de los factores de virulencia que vimos, otro mecanismo importante que influye en la patogenicidad de los uropatógenos, es la capacidad que tienen de generar resistencia a muchos antimicrobianos.

Esta resistencia puede ser natural o intrínseca.

También la resistencia generada por las bacterias puede ser adquirida, inactivando su acción por mecanismos como: producción de enzimas o bien no posibilitando su acción al impedirles su entrada a la célula bacteriana (disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana) o bien modificando el sitio de acción de los mismos.

A esta complejidad de los mecanismos que pone en juego el microorganismo para agredir al huésped vulnerable y además perpetuar su estirpe, se le enfrentan factores que actúan en conjunto para evitar el desarrollo de las infecciones.

Entre ellos, el pH de la orina, la elevada osmolalidad y la alta concentración de urea, hacen a la orina un mal medio de cultivo para los microorganismos. Además el peristaltismo uretral, impide el ascenso de bacterias (de allí las frecuentes ITU en embarazadas que tienen alteración de pH y osmolalidad y disminución de peristaltismo uretral).

A ello se agrega: los niveles de PTH que atentan contra la adherencia bacteriana a las células epiteliales, y la presencia de líquido prostático con acción inhibitoria, en varones, lo que explica el menor desarrollo de bacterias en la orina de este sexo.

Tanto el LPS y la adherencia bacteriana son responsables de la producción de citoquinas, elementales en la defensa del huésped.

A todo lo anteriormente mencionado, es de importancia destacar, que los uropatógenos, provocan una importante respuesta inflamatoria en el tracto urinario, lo que estimula a las células uroepiteliales y otras que producen citoquinas y otros factores proinflamatorios **(Capítulo 1)** que conducen a la producción de fiebre por la interleucina IL-I y IL-6 y a la activación de la respuesta de fase aguda, como la producción de IL-8, quimiotáctica, responsable de la piuria y contribuye a la erradicación bacteriana. Una deficiencia en receptores para IL-8, predispone a la pielonefritis

Con todo lo que hemos revisado en este apartado de las ITU, concluimos que, dado que diferencias importantes en la susceptibilidad del huésped a la infección y diferencias importantes en la virulencia de los patógenos involucrados, sustentan la aparición o no, en circunstancias semejan-

tes, de una infección, debemos ser cuidadosos a la hora de realizar este tipo de estudios en el laboratorio.

Como vimos, solo desde miradas clínicas, epidemiológicas y microbiológicas podemos aportar, desde el laboratorio, a mejorar la calidad de vida de estos pacientes.

La clínica y el tratamiento ■ mabel rinaldi

Las infecciones del tracto urinario constituyen una de las entidades clínicas más prevalentes, estimándose que 20 a 35% de las mujeres presentarán al menos un episodio de ITU a lo largo de su vida.

Pueden afectar a individuos de cualquier edad y condición, con una especial incidencia en mujeres de cualquier edad, hombres en edades extremas de la vida, receptores de trasplante renal y en pacientes con cualquier anomalía estructural o funcional del tracto urinario.

De forma adicional, la ITU constituye la principal causa de sepsis en pacientes hospitalizados y hasta un 50% de las infecciones nosocomiales tienen su origen en el tracto urinario, en su mayoría en relación con el uso de catéteres urinarios.

Un 10-15% de los enfermos incluidos en programas de hemodiálisis llegan a esta situación como consecuencia de infecciones urinarias a repetición.

Por lo expuesto es fácil entender que las ITU llevan implícita morbilidad importante, mortalidad no despreciable y un costo económico elevado.

En la última década, la búsqueda de regímenes terapéuticos que permitan un mejor cumplimiento, menor costo y una menor incidencia de efectos adversos, ha supuesto una importante innovación en el manejo del paciente con ITU.

La clasificación de las ITU se basa en la localización y frecuencia de la infección, así como en factores que pueden complicarla.

Los factores que se consideran son: edad, sexo, enfermedades subyacentes (alteraciones estructurales de las vías urinarias y/o alteraciones de la inmunidad), instrumentación de la vías urinarias, presencia de sonda vesical, cálculos renales, origen de adquisición de la infección (comunidad, intrahospitalaria), embarazo, frecuencia y antecedentes de consumo de antibióticos.

La valorización y correcta identificación de estos factores revisten gran importancia para el diagnóstico y tratamiento de la infección.

Clasificación de las infecciones urinarias según su localización

Infección urinaria alta: pielonefritis o infección del tracto urinario alto es la que afecta al riñón y la pelvis renal.

Infección urinaria baja: cistitis, uretritis, prostatitis y epididimitis.

Clasificación según la ausencia o presencia de factores

Infección urinaria no complicada: afecta a individuos que tienen un tracto urinario estructural y funcionalmente normal. No están relacionadas con enfermedades sistémicas que alteren o modifiquen el sistema inmunológico.

Infección urinaria complicada: implica la existencia de factores del huésped que pueden promover la persistencia o recurrencia de la infección, como, anomalías estructurales o funcionales del sistema excretor, embarazo, vejiga neurogénica (reflujo de orina desde la vejiga a los uréteres por disfunción de la unión vesicoureteral), infección adquirida en el hospital, manipulación reciente de las vías urinarias, diabetes mellitus, estados de inmunosupresión (incluyendo infección por VIH), enfermedad renal poliquística (enfermedad hereditaria de origen genético y secundaria a la mutación autosómica de los genes PKD1) que se caracteriza por el desarrollo de quistes llenos de fluidos en los túbulos renales.

Estos quistes pueden ser múltiples y alcanzar gran tamaño afectando ambos riñones que evolucionan a la insuficiencia renal.

Otros órganos pueden ser afectados como hígado y cerebro.

Infección urinaria recurrente: puede obedecer a recidiva o reinfección.

Recidiva: infección recurrente producida por el mismo microorganismo, que acontece por regla general en las dos semanas que siguen a la conclusión del tratamiento antimicrobiano.

Reinfección: es producida por especies diferentes de cepas microbianas y de forma habitual ocurre más allá de dos semanas de la finalización del tratamiento.

Bacteriuria significativa: denota la presencia de más de 10^5 unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias patogénicas por mililitro de orina, con o sin síntomas.

Bacteriuria asintomatica: es una bacteriuria significativa sin manifestación clínica.

La prevalencia de bacteriuria aumenta con la edad, siendo mayor en mujeres que en hombres.

Es más remarcable en aquellos adultos mayores que están institucionalizados (15-35% en hombres y 25-50% en mujeres).

Se considera que una alta proporción de personas pertenecientes a esta población presenta bacteriuria en algún momento de su vida.

Son varios los factores que favorecen la bacteriuria de los adultos mayores: cambios fisiológicos del tracto urinario; cambios hormonales en la mujer; hipertrofia prostática; disfunción vesical y vesicoureteral relacionadas con enfermedades crónicas comunes en esta población, diabetes, uso de antidepresivos y sedantes e incontinencia vesical y/o intestinal.

Mención especial merece la presencia de bacteriuria en la mujer embarazada por la morbilidad y riesgo de mortalidad del binomio madre-feto a la que está vinculada.

Se estima que entre el 2 a 8% de todas las embarazadas presentan bacteriuria asintomática y que sin el diagnóstico y tratamiento oportuno el 30% de estas evolucionaran a pielonefritis, sepsis, insuficiencia renal, además del riesgo aumentado de dar a luz a neonatos prematuros y de bajo peso.

Los factores que incrementan la susceptibilidad de la ITU en las mujeres embarazadas son: disminución del tono y peristaltismo ureteral e insuficiencia de las válvulas vesicoureterales, entre otros.

> **Las manifestaciones clínicas de ITU son variables y dependen de la edad del paciente y localización de la infección.**

Cistitis

La cistitis se caracteriza por aparición de disuria, polaquiuria (micción frecuente y de poco volumen) y micción urgente.

Algunos pacientes pueden manifestar tenesmo (deseo imperioso de orinar asociado a dolor e insatisfacción por la escasa micción), dolor suprapúbico que aumenta con la micción en goteo terminal (estranguria).

La orina presenta turbidez por la presencia de leucocitos, piocitos, hematíes y bacterias, se torna maloliente y en hasta un 30% de la orina es francamente hematúrica.

La fiebre y otras manifestaciones sistémicas son raras.

Sin embargo hasta un 30% de los pacientes con bacteriuria significativa y clínica de cistitis tienen una infección urinaria alta.

Los factores relacionados con el desarrollo de cistitis son: relaciones sexuales frecuentes, uso de diafragma, uso de espermicida y falta de micción post coito.

La disuria acompañada de polaquiuria y tenesmo vesical en ausencia de síntomas de infección vaginal tiene un valor predicativo diagnóstico de ITU de un 80%.

Los signos y síntomas de cistitis aparecen en forma abrupta.

En presencia de signos y síntomas de cistitis y ante un primer episodio se puede iniciar tratamiento antibiótico sin la necesidad de realizar estudio de urocultivo, o bien solo utilizar un estudio de sedimento urinario.

> Signos y síntomas de cistitis

Hematuria	Disuria
Dolor en hipogastrio	Polaquiuria
Disuria	Urgencia miccional

Si la paciente presenta signos y síntomas de infección vaginal corresponde realizar examen ginecológico y toma adecuada de muestra para el examen bacteriológico.

Ante una paciente que ha presentado 2-3 episodios de infección urinaria en 6 meses merece ser estudiada en forma inicial con ecografía de las vías urinarias en búsqueda de lesiones estructurales, obstrucciones y/o búsqueda de cálculos. Dependiendo de los hallazgos y de la sospecha diagnóstica (abscesos renales, perirrenales, uropionefrosis y presencia de tumores) se podrá complementar con urograma excretor y/o tomografía axial computada (TAC)

> Pronóstico

La cistitis no es una infección considerada grave, sí está relacionada con morbilidad y alteración de la calidad de vida.

Se estima que cada episodio de cistitis genera 2,5 días de actividad restringida y 1,2 días de pérdida laboral.

Infección urinaria alta

> Pielonefritis

La pielonefritis es un cuadro infeccioso grave que constituye la forma más seria de infección del tracto urinario que se caracteriza por la infección del parénquima renal y del sistema colector.

Las mujeres entre 20 y 40 años son las más frecuentemente afectadas.

La pielonefritis se manifiesta como un síndrome miccional agudo que se acompaña de escalofríos, fiebre, dolor lumbar, náuseas y vómitos

En el examen físico el paciente presenta dolor en la palpación renal como en la percusión del ángulo costo vertebral y en los puntos ureterales superiores.

La infección urinaria alta complicada es aquella que se presenta en el marco de obstrucción o bien en presencia de los factores previamente descriptos.

En ancianos e inmunodeprimidos, los signos y síntomas de afectación renal pueden ser escasos, predominando signos y síntomas de sepsis.

En la ITU alta, la bacteriemia puede estar presente en 10-25% de los enfermos.

La aparición de shock séptico es poco habitual y cuando aparece debe descartarse complicación obstructiva.

Es importante saber que pueden existir formas incompletas o subclínicas (pielonefritis oculta) en las que no aparecen algunos de los datos clínicos y/o exploratorios característicos. Por ejemplo, en los ancianos la ITU puede expresarse con deterioro del estado general o incontinencia urinaria.

Aproximadamente el 80% de los pacientes con pielonefritis presentan un recuento de colonias superior a 10^5 UFC y un 10-15 % 10^4 UFC.

El Consenso Argentino de Ínter sociedades para el manejo de la infección urinaria (2006) consideró como significativo un recuento de 10^4 UFC/ml para el diagnóstico de pielonefritis con sensibilidad de 90-95 %.

Mencionaremos a continuación diversas complicaciones supurativas de la ITU que deben ser consideradas en enfermos que fracasan en responder al tratamiento convencional.

> Necrosis papilar aguda

Una de las formas peculiares de uropatía obstructiva a tener presente es la necrosis papilar aguda, especialmente en pacientes diabéticos y en consumidores crónicos de analgésicos.

> Pielonefritis enfisematosa

La pielonefritis enfisematosa es una entidad grave caracterizada por necrosis isquémica del parénquima renal con infección por gérmenes productores de gas, que incide de un modo especial en ancianos con diabetes mellitus.

En esta pionefrosis existe infección del parénquima renal con hidronefrosis secundaria a obstrucción ureteral.

> Nefritis bacteriana focal

La nefritis bacteriana focal denota un proceso infeccioso caracterizado por inflamación renal localizada.

Los abscesos renales y perinéfricos representan dos formas infrecuentes de infección parenquimatosa y suelen acontecer en pacientes con complicaciones obstructivas (litiasis) y con menor frecuencia ser el resultado de la infección de un quiste renal.

Se localizan en la unión cortico-medular y su presentación clínica, a diferencia de la pielonefritis aguda, es más insidiosa, con fiebre prolongada y síntomas constitucionales asociados o no a dolor lumbar y en flanco.

> Abscesos corticales

Los abscesos corticales son cuadros secundarios a la diseminación hematógena de una infección por *Staphylococcus aureus*.

Cuando los abscesos corticales confluyen forman el ántrax renal, que puede romperse a las vías urinarias o hacia el espacio perinéfrico.

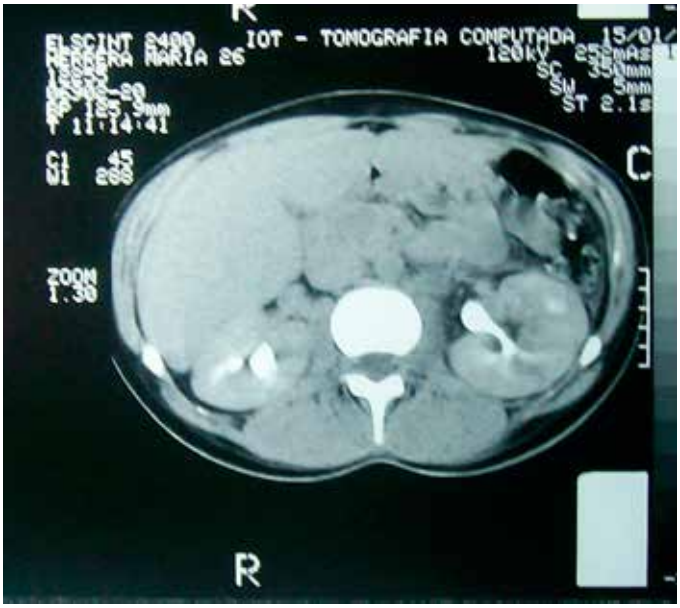


Imagen 1. Paciente con diagnóstico de infección urinaria complicada. Observe aumento del tamaño renal derecho y dos áreas hipo intensa que corresponden a abscesos renales en formación.

> Pielonefritis xantogranulomatosa

Finalmente la pielonefritis xantogranulomatosa hace referencia a un proceso inflamatorio crónico del parénquima renal que acontece en pacientes con episodios recurrentes de ITU, a menudo complicados con litiasis o uropatía obstructiva.

Puede confundirse con neoplasia renal y el rasgo histológico característico es la presencia de macrófagos cargados de lípidos.

> Uretritis

Se estima que alrededor de un 30% de las mujeres que presentan disuria, polaquiuria y piuria presentarán urocultivo sin desarrollo o con un recuento no significativo de UFC/ml.

En esta situación corresponde investigar agentes transmitidos por contacto sexual como ser: virus herpes simple, *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*.

Clínicamente no es factible realizar un diagnóstico diferencial entre cistitis y uretritis por lo cual la evolución de los signos y síntomas pueden orientar hacia el diagnóstico correcto.

En presencia de una paciente con inicio gradual de los síntomas de más de 7 días de evolución y que no presente hematuria y dolor suprapúbico es más orientador de uretritis vinculada a enfermedad de transmisión sexual.

La presencia de dolor suprapúbico y hematuria en conjunción con inicio agudo de los síntomas urinarios, sugiere fuertemente el diagnóstico de cistitis.

> Prostatitis

La ITU en hombres menores de 50 años es infrecuente y siempre es complicada.

Sin embargo la uretritis se contrae a edades más jóvenes y está estrechamente vinculada a enfermedades de transmisión sexual: uretritis por *N. gonorrhoeae* y *U. urealitycum*,

Con el agrandamiento prostático que se presenta (quinta década de la vida) la pielonefritis, prostatitis y por consiguiente la necesidad de instrumentación de las vías urinarias favorecen al aumento en la incidencia de las UTI.

La prostatitis aguda afecta a adultos jóvenes o a enfermos portadores de sonda uretral permanente.

Se presenta clínicamente con fiebre, escalofríos, estranguria y dolor perineal.

En el examen clínico el tacto rectal muestra una próstata grande y dolorosa. Debe evitarse un masaje vigoroso por el riesgo de bacteriemia.

En la prostatitis crónica los síntomas pueden ser más difusos y la próstata es frecuentemente normal en el examen rectal.

Infección urinaria en hombres- agentes etiológicos

Uretritis		*N. gonorrhoeae - U.urealyticum*
Prostatitis	men. de 35 años	*N. gonorrhoeae - C. trachomatis*
	may. de 35 años	*Enterobacterias* spp. - *Enterococcus* spp. *Ps. aeruginosa*
Cistitis Pielonefritis		*E. coli - Proteus* spp. - *Providencia* spp. *Enterococcus* spp. - *Staphylococcus* spp.

> Infecciones del tracto urinario en pediatría

En pacientes pediátricos es muy difícil diferenciar la infección urinaria alta de la baja, como se describe en los pacientes adultos.

Los criterios de laboratorio para localizar la infección carecen de sensibilidad y especificidad en los niños.

Por lo tanto cuando hablamos de infección urinaria en este grupo etareo están incluidas las entidades clínicas como uretritis, cistitis y pielonefritis

La infección urinaria representa la segunda causa más frecuente de infecciones bacterianas en la infancia.

Se estima que hasta un 5% de los niños menores de 2 años con fiebre de causa desconocida presenta infección urinaria.

En pediatría se clasifica a la infección urinaria de la siguiente forma: infección urinaria complicada y no complicada.

Infección urinaria complicada es aquella que se presenta en neonatos, en pacientes con signos clínicos de píelonefritis y en aquellos niños que presentan anomalías estructurales.

> Diagnóstico

El diagnóstico de una ITU descansa fundamentalmente en dos pilares: examen clínico y el diagnóstico de laboratorio.

Eventualmente se precisan evaluaciones radiológicas y urológicas, de formas especiales, en casos de ITU complicada.

> El tratamiento

Los objetivos del tratamiento de las infecciones urinarias son:

* Eliminar la infección.
* Aliviar los síntomas agudos
* Prevenir o minimizar el daño del parénquima renal.
* Prevenir las infecciones recurrentes

El tratamiento de una ITU debe basarse en factores dependientes del huésped, del microorganismo y en factores farmacológicos.

Debemos tener presente el riesgo y prevalencia de resistencia al agente antimicrobiano seleccionado y la susceptibilidad del patógeno.

Fármacos tradicionales en el tratamiento empírico de una ITU en el medio extrahospitalario, como ampicilina y trimetoprima sulfametoxazol (TMS), no pueden aconsejarse hoy día en nuestro medio, dado el elevado porcentaje de uropatógenos resistentes.

Las consideraciones farmacológicas del antimicrobiano deben incluir una adecuada biodisponibilidad oral, alcanzar altas concentraciones en la orina, tener un mínimo impacto sobre la flora fecal y vaginal y una vida media prolongada.

El objetivo del tratamiento debe ser la erradicación de los patógenos, prevenir las recurrencias y minimizar los efectos adversos del antibiótico en cuestión.

Un tratamiento de tres días es suficiente en casos de cistitis aguda no complicada.

Por otro lado una prostatitis crónica precisa varios meses de tratamiento, como consecuencia de la escasa penetración de antibióticos en la glándula prostática.

Cistitis aguda

Ante una mujer joven con clínica compatible con cistitis y sedimento urinario con reacción inflamatoria más la visualización de bacterias en la tinción de Gram en el primer episodio, debe iniciarse tratamiento obviando la necesidad de urocultivo.

El objetivo del tratamiento debe ser la erradicación de la infección de la mucosa del tracto urinario inferior y de las clonas uropatogénicas en la

vagina y tracto gastrointestinal inferior, manteniendo intacta la flora vaginal normal.

En este sentido las fluoroquinolonas (FQ) (norfloxacina, u ofloxacina) alcanzan altas concentraciones en las secreciones vaginales y representan el tratamiento de elección.

Los antibióticos ß-lactámicos (amoxicilina-clavulánico, o una cefalosporina de 1ra generación) pueden también usarse, si bien el porcentaje de re-infecciones es superior al observado cuando se emplea una quinolona.

Estudios recientes demuestran que cuando se opte por los antibióticos ß-lactámicos se los debe administrar por 5-7 días.

Con respecto al uso de TMS se debe tener presente los datos de resistencia local de los uropatógenos para este antibiótico.

Se estima que cuando este porcentaje es superior al 20% se deberá recurrir a otro antibiótico como ser las quinolonas.

En nuestro país un estudio realizado por la Sociedad Argentina de Infectología (vigi-A/ SADI) periodo 2000-2003 demostró que la tasa de resistencia de TMS global era de 15% para infecciones urinarias bajas no complicadas.

En el estudio realizado por el sistema informatizado de resistencia (SIR) periodo de 2.000 2.004 no se realizó una discriminación de las muestras provenientes de ITU complicadas de la no complicada por lo cual la tasa de resistencia global encontrada para TMS fue de 22,3 %.

Para la toma de decisión del inicio empírico del tratamiento antibiótico varias consideraciones deben ser tenidas en cuenta, como ser: uso previo de TMS 3-6 meses previos, antecedentes de internaciones previas, presencia de diabetes mellitus y uso de otros antibióticos.

Son factores que están estrechamente relacionados con ITU por uropatógenos resistentes.

Tradicionalmente la duración del tratamiento de una cistitis no complicada consistía en un régimen oral de un antimicrobiano durante 7-14 días.

Sin embargo en la última década ha quedado demostrado que tratamientos cortos (3 días) son igualmente eficaces.

Una dosis única (p. ej. 3 g de fosfomicina) también erradica la infección vesical por alcanzar altas concentraciones en orina y por tiempo prolongado por lo cual es una buena opción para el tratamiento de ITU baja no complicada.

En pielonefritis se recomienda la realización de urocultivo y una duración más prolongada del tratamiento (7-10 días)

Cistitis que no responde al tratamiento instituido

Si la sintomatología miccional no se resuelve durante el tratamiento debe solicitarse un urocultivo y antibiograma, y luego realizar las modificaciones en función del resultado de los mismos.

La resistencia a un agente antimicrobiano, fundamentalmente en la flora fecal, es la principal causa de ITU baja no resuelta.

Esta resistencia suele estar mediada por plásmidos y suele acontecer en pacientes que reciben penicilinas.

Las FQ, a las dosis anteriormente señaladas, representan una buena elección mientras se recibe el antibiograma.

Otra causa menos frecuente es el desarrollo de resistencia de una bacteria inicialmente susceptible y obedece a la selección de una clona resistente, la cual era inicialmente indetectable por su baja concentración.

Finalmente factores dependientes del huésped tales como insuficiencia renal y la presencia de litiasis también deben considerarse ante un enfermo con ITU baja no resuelta.

Infección urinaria recurrente

Las infecciones urinarias recurrentes se definen como: al menos dos episodios de ITU en

seis meses o tres o más infecciones en un año.

La recurrencia puede deberse a recidiva o, más frecuentemente, re-infección en meses distintos.

Un 6% de las mujeres jóvenes tienen infecciones recurrentes tras un episodio de cistitis. Estas recurrencias generalmente no están asociadas a anormalidades urológicas, pero sí están vinculadas a determinada susceptibilidad genética que presentaría un grupo de mujeres, por presentar receptores epiteliales del tipo no secretor.

E. coli tiene más avidez y capacidad de unión por los pilis a los receptores de las células uroepiteliales en probable relación con la falta de secreción de antígenos de grupo sanguíneo (no secretores)

El uso de diafragma o espermicida se ha relacionado con ITU recurrente y su uso debe desaconsejarse en estas pacientes.

El tratamiento antimicrobiano profiláctico se encuentra indicado en casos de ITU recurrente y puede administrase de forma crónica (diaria-

mente o tres veces por semana), de forma intermitente (cuando aparezcan los síntomas) o después del coito.

El antibiótico seleccionado se basará en la susceptibilidad del patógeno aislado en el último episodio.

Los antimicrobianos que se indican con más frecuencia son

- norfloxacina 400 mg/ tres veces por semana
- nitrofurantoina 100 mg/día
- TMS 80/400 mg tres veces por semana.

Recordar que no debe usarse TMS ni ser investigada ni informada ni ensayada cuando el agente es *Enterococcus* spp., aunque haya actividad en el antibiograma por su incapacidad de utilizar ácido fólico, timina ni timidina exógena, por lo que cotrimoxazol no puede ejercer antagonisno in vivo, que es el mecanismo de la droga.

Las quinolonas no deben ser ensayadas para *Enterococcus* spp., en la mujer con ITU no complicadas.

Medidas adicionales como la ingesta abundante de agua y realizar micciones frecuentes, especialmente después del coito, puede ser beneficiosas.

El tiempo de la administración de la profilaxis es de 6-12 meses.

La ITU recurrente puede ser un problema en la mujer posmenopáusica; el déficit hormonal de estrógeno esta asociado con disminución de la colonización por *Lactobacillus* y una colonización aumentada de *E. coli.*

Está ampliamente demostrado que la aplicación tópica de estrógeno (estriol 0,5 mg) en la mucosa vaginal por el lapso de dos semanas, seguido por una administración bisemanal durante ocho meses, disminuye en forma importante la colonización vaginal por enterobacterias.

La profilaxis antibiótica puede prevenir los episodios sintomáticos, pero la recurrencia luego de 3 meses de suspendida la profilaxis, se presenta en el 50 % de las pacientes.

Pielonefritis aguda

El espectro clínico de una pielonefritis aguda es variable, desde casos con moderada afectación del estado general a situaciones de shock séptico.

El urocultivo debe realizarse a todo paciente con sospecha de pielonefritis.

En aquellos que presenten criterios de internación (paciente febril, taquicárdico, taquipneico, deshidratado, con dolor abdominal, presencia de vómito o inseguridad para el cumplimiento del tratamiento) es de buena práctica solicitar la extracción de sangre para realización de hemocultivos, los que pueden ser positivos hasta en un 20% de los casos.

En ausencia de náuseas, vómitos o afectación importante del estado general puede prescribirse un antibiótico oral en forma empírica durante 7-10 días con ciprofloxacina 500 mg cada 12 horas. Este esquema se mantendrá hasta la obtención del antibiograma el cual dirigirá el tratamiento adecuado.

En pacientes con criterios de internación se recomienda la administración parenteral de ciprofloxacina 400 mg cada 12 horas.

En pacientes embarazadas se puede utilizar ampicilina sulbactama 1,5 g cada 6 horas o cefazolina 1 g cada 8 horas.

En pacientes con antecedentes de consumo de antibiótico previo, una opción es ceftriaxona 1 g cada 24 horas por 48 horas. Luego de la remisión de la fiebre y de los síntomas acompañantes se puede pasar a la vía oral con un antibiótico elegido y dirigido por el antibiograma.

En pacientes que presentan signos de inestabilidad hemodinámica, el tratamiento empírico consistirá en (ciprofloxacina, ceftazidima en combinación con un aminoglucósido)

Si en la tinción de Gram se observa la presencia de cocos grampositivos deberá emplearse, ampicilina sulbactama más gentamicina.

En pacientes con antecedentes de manipulación de las vías urinarias, internaciones prolongadas en el ámbito hospitalario, la terapéutica empírica inicial deberá estar acorde con el germen y perfil de resistencia de la institución.

Cuando el paciente provenga de instituciones de la que se desconozca el perfil de susceptibilidad se podrá iniciar la administración de carbapenem, cefepime o piperacilina tazobactama.

Es aconsejable en estos casos asociar un aminoglucósido a excepción de cuando se utilice imipenem.

Es importante remarcar, que toda terapéutica empírica inicial deberá ser corregida según hallazgo bacteriológico y perfil de susceptibilidad definido en el antibiograma.

En pacientes que no respondan al tratamiento antibiótico elegido en forma empírica o por antibiograma, se debe proceder a descartar complicaciones supurativas focales o bien de estar en presencia de resistencia microbiana al esquema elegido.

Infección urinaria complicada

Cistitis y pielonefritis aguda complicada

La ITU complicada hace referencia a la presencia de anomalías estructurales o funcionales del aparato urinario.

Por tanto resulta determinante la práctica de un urocultivo antes de iniciar tratamiento en un enfermo sintomático.

Si la afectación clínica es moderada puede usarse una FQ por vía oral.

En pacientes en mal estado general con inestabilidad hemodinámica y antecedentes de uso previo de antimicrobianos, internación hospitalaria, o manipulación de las vías urinarias, se deberá internar al paciente e iniciar luego la toma de muestra de orina y sangre para cultivos correspondientes.

Antimicrobianos que se pueden utilizar son: ciprofloxacina, piperacilina/ tazobactama, ceftazidima, cefepime en combinación con aminoglucósido, o bien monoterapia con imipenem.

Los pacientes con indicación de inicio de tratamiento por vía endovenosa que evolucionan bien a las 72 horas, podrán continuar el tratamiento con antimicrobianos por vía oral, siempre y cuando se disponga de opciones terapéuticas que puedan ser usadas por esta vía.

Si el paciente está recibiendo un esquema antimicrobiano guiado por cultivo y antibiograma y no presenta buena evolución a las 72 horas, se deberá indicar la búsqueda de supuraciones renales y/o perirrenales a través de estudios de imágenes como ser ecografía, TAC y/o urograma excretor.

La duración del tratamiento de una ITU complicada no está establecida, si bien generalmente se recomiendan 10-14 días, pero este lapso podrá extenderse en presencia de abscesos.

En esta situación es imperativo el drenaje y la corrección de cualquier anomalía urológica reversible.

Infección urinaria en la embarazada

El tratamiento de la bacteriuria asintomática y la cistitis aguda en la embarazada se basa en la administración durante tres y siete días respectivamente de un antimicrobiano.

La amoxicilina, ampicilina, nitrofurantoína o la cefalexina se muestran seguras durante la gestación.

La nitrofurantoina se puede utilizar en el primer y segundo trimestre. No se aconseja su uso en el último trimestre, aunque recientemente una revisión realizada por Hailey en 1983, de los efectos adversos en 165 embarazadas realizada en quienes recibieron terapia con nitrofurantoina en los tres trimestres de embarazo, no encontró un incremento en la incidencia de anormalidades fetales comparada con la población general.

Las FQ, por sus efectos adversos sobre el cartílago fetal, están contraindicadas.

La pielonefritis aguda requiere ingreso hospitalario y administración parenteral de ß-lactámicos durante dos semanas.

En situaciones especiales se puede utilizar gentamicina por períodos breves (3 días) y en monodosis.

Gentamicina es un antibiótico bactericida que ofrece buena cobertura para bacterias gram negativas y *Enterococcus* spp., por lo cual se lo puede utilizar en monoterapía para el tratamiento de infecciones urinarias ocasionadas por bacterias gramnegativas.

La gentamicina se utiliza también como agente sinergista en infecciones invasivas ocasionadas por *Enterococcus* spp*.,* En esta situación en el laboratorio se ensaya disco con alta carga del antimicrobiano, a fin de investigar la probabilidad de éxito de la sinergia.

Fosfomicina es una alternativa útil, eficaz y segura por presentar baja tasa de resistencia en monodosis.

Este antimicrobiano es activo contra: *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp.

El mecanismo de acción es la inhibición de la pared bacteriana y se excreta totalmente por orina como metabolitos activo.

La fosfomicina debe ingerirse con el estomago vacío y luego de la micción.

Su uso en monodosis está indicado para el tratamiento de la cistitis, o bien en profilaxis post coital para mujeres que presenten infecciones recurrentes.

La Asociación Argentina de Microbiología (AAM) recomienda su uso asociada con aminoglucósido (gentamicina) con el objetivo de lograr sinergia y disminuir el riesgo de aparición de resistencia.

Los antibióticos mas comúnmente empleados en la mujer embarazada son:

- ceftriaxona 1 g cada 24 horas.
- cefalotina 1 g cada 6 horas.
- cefazolina 1g cada 8 horas.
- ampicilina sulbactam 1,5 cada 8 horas.

Las pacientes tratadas previamente por cistitis o por bacteriuria asintomática deben ser seguidas con urocultivo mensuales, por el riego de recurrencia, el que está estimado en el 25 % de los casos y este riesgo aumenta con el transcurso del embarazo.

Las pacientes que presenten bacteriuria persistente o infecciones recurrentes se les deberán garantizar profilaxis antibiótica hasta el parto.

Los antimicrobianos y las dosis utilizadas como profilaxis en las mujeres embarazadas son:

- TMS 40/200 mg (el uso de TMS se debe evitar en el 1er y 3 er trimestre de embarazo)
- nitrofurantoina 50-100 mg por día.
- cefalexina 250 mg día.

Prostatitis aguda

La prostatitis aguda requiere tratamiento antimicrobiano prolongado (al menos 4-6 semanas) con cobertura amplia frente a organismos gramnegativos.

La ciprofloxacina (500 mg vo/12 h) u ofloxacina (200 mg vo/12 h) consigue una aceptable difusión en las secreciones prostáticas.

Es necesaria la realización de urocultivo previo al inicio del tratamiento con antimicrobiano.

Ante la sospecha de bacteriemia o en presencia de retención urinaria se deberá indicar la hospitalización y tratamiento antimicrobiano parenteral con alguna de las pautas señaladas en la pielonefritis aguda, previa extracción de hemocultivos y urocultivo.

La infección recurrente puede obedecer a persistencia de foco supurativo glandular o a infección por *Pseudomonas* spp *o Enterococcus* spp de modo especial en el paciente portador de catéter urinario. En estos casos se puede optar por un tratamiento antimicrobiano prolongado o durante las recurrencias, o bien la exéresis quirúrgica de la glándula infectada.

Infección urinaria asociada a catéter

La prevención es sin duda la mejor medida para reducir la morbimortalidad en infecciones relacionadas con catéteres urinarios.

> **Una inserción estéril, el uso de sistemas cerrados y el retiro precoz del catéter representan medidas eficaces para disminuir la incidencia de estas infecciones.**

La cateterización intermitente en enfermos medulares ha modificado la historia natural y complicaciones asociadas a la ITU en esta población.

En general no hay indicación de profilaxis antimicrobiana, con la excepción de pacientes de alto riesgo (antes de cirugía urológica) que precisen cateterización por un corto periodo de tiempo (menos de 30 días).

Cuando aparezcan síntomas de infección se procederá a retirar el catéter y a la administración de antimicrobianos siguiendo las pautas recomendadas en el apartado de ITU complicada.

La bacteriuria asintomática en el portador de catéter no precisa tratamiento, con la excepción del aislamiento de gérmenes productores de ureasa.

En estos casos se recomienda tratamiento antimicrobiano durante 3-5 días, por ejemplo con una fluoroquinolona.

Bacteriuria asintomática

Ya se ha comentado en apartados anteriores el manejo de la bacteriuria asintomática en la mujer embarazada y en el enfermo portador de catéter urinario.

En el paciente que va a ser sometido a cirugía urológica, la detección de bacteriuria y su tratamiento ha reducido la incidencia de complicaciones postoperatorias, incluyendo la bacteriemia.

Por lo tanto, en este grupo de enfermos, el tratamiento de bacteriuria asintomática es claramente beneficioso.

La bacteriuria asintomática en el paciente anciano, diabético sin anomalías estructurales o funcionales del tracto urinario, no precisa tratamiento, dado que no se ha demostrado claramente un beneficio potencial en reducir la morbimortalidad.

Las indicaciones precisas para el tratamiento de la bacteriuria asintomática son:

- Mujer embarazada
- Paciente que requiera procedimiento diagnóstico o terapéutico sobre las vías urinarias.
- Paciente a quien se le colocara prótesis de grandes articulaciones y cirugía cardiovascular con colocación de válvulas o prótesis.
- Paciente inmunosuprimido

Infección urinaria en pediatría

En pacientes pediátricos no se recomienda el uso de curso corto (3 días).

En esta población se mantiene el tratamiento convencional (7-10 días)

Se deben internar los pacientes con infección urinaria y o sospecha en las siguientes situaciones:

- Menor de 3 meses y según cuadro clínico a los menores de 6 meses.
- Los pacientes que presenten signos clínicos de bacteriemias o de pielonefritis grave.
- Los pacientes deshidratados especialmente lactantes, que presenten vómitos, diarrea o poliuria de gran importancia.
- Pacientes con fallo renal asociado.

Esquema empírico inicial en infecciones urinarias de la población pediátrica

Pacientes hospitalizados

ceftriaxona 50-80 mg/kg/día 1/día IM.
cefotaxima 100-150 mg/kg/día c/ 8 hs EV

Pacientes ambulatorios
Cefalosporina de 1ra generación Cefadroxilo o 30 mg/kg/día c/12 horas VO
Cefalexina o 50 mg/kg/día c/6{8 horas VO
Ceftriaxona (en situaciones especiales) 80 mg/kg/día IM

IM: intramuscular, VO: via oral, EV: endovenosa

No está recomendado el uso de quinolonas (norfloxacina, ciprofloxacina, levofloxacina) en pacientes pediátricos

En pacientes de más de 15 años se emplean con muy buena eficacia, **no obstante deben ser considerados antibióticos de reserva.**

Las concentraciones de ciertos antimicrobianos como ser: los ß-lactámicos, nitrofuranos, la mayoría de las FQ, TMS y aminoglucósidos y las de otros que se excretan inalterados o como metabolitos activos, pueden alcanzar valores extremadamente altos en la orina en relación a los alcanzados en las concentraciones séricas.

Existe controversia en considerar cual es la concentración del antimicrobiano que elimina la ITU.

Algunos autores consideran que la eliminación de la ITU depende de la concentración alcanzada en el parénquima renal y otros sostienen que las concentraciones séricas son las útiles para limitar la infección del parénquima renal y para la eliminación de bacteriemia.

Recientemente numerosas evidencias demuestran que los niveles urinarios son los mejores predictores de éxito terapéutico (excluidos neonatos y lactantes menores)

Este grupo de pacientes debe ser cuidadosamente valorado por presentar mayor riesgo de bacteriemias y de desarrollar sepsis, por lo cual es importante lograr una concentración adecuada en el parénquima renal, además de mantener una concentración sérica a fin de erradicar la bacteriemia

Resumen de conducta diagnóstica y tratamiento:
Cistitis

- La cistitis no complicada se trata empíricamente sin realizar urocultivo.
- Este se hace necesario en: formas recurrentes o complicadas, embarazo, hombre, sospecha de microorganismo resistente.
- Duración del tratamiento 3 días, salvo nitrofurantoina 7 días y fosfomicina monodosis con aminoglucósido.

- En pacientes: embarazada, diabética, mayor de 65 años, hombre, falla del tratamiento, infección recurrente (recaída o re-infección) y cistitis complicada, la duración del tratamiento no deberá ser inferior a 7 días.

Pielonefritis

- Son necesarios urocultivo, hemocultivo y el estudio de sensibilidad de los microorganismos involucrados.
- Iniciar el tratamiento inmediatamente después de las tomas para el estudio microbiológico.
- El tratamiento empírico inicial es guiado por la tinción de Gram de la orina.
- Hospitalización y tratamiento inicial por vía parenteral en: formas severas o complicadas, embarazo o intolerancia a medicación oral.
- Duración media del tratamiento: 10 a 14 días.

Selección del plan de antimicrobianos

El plan empírico de antimicrobianos se selecciona según:

- Los microorganismos que con mayor frecuencia producen ITU y sus respectivos patrones de sensibilidad en el medio.
- Las cualidades del antimicrobiano (espectro de actividad, absorción, distribución y eliminación)
- Tipo de ITU
- Características del huésped.

El antimicrobiano seleccionado debe alcanzar buena concentración en orina.

En ITU alta el antimicrobiano también debe alcanzar buena concentración en sangre y parénquima renal.

Entre varios agentes de igual eficacia preferir el menos tóxico, con menos efectos secundarios, más fácil de administrar y de menor costo económico; cuidando siempre de retardar la selección de cepas resistentes.

Para iniciar un tratamiento empírico se prefieren las FQ.

La elevada tasa de resistencia de los microorganismos a aminopenicilinas, aminopenicilinas/IBL, cefalosporinas de 1ra generación y TMS, hace que estos antimicrobianos sólo se usen cuando se haya diagnosticado su sensibilidad.

Cuando a las 48 o 72 horas se conoce el agente etiológico, su sensibilidad, en función de la respuesta clínica, se hará la adaptación terapéutica correspondiente. Se prefieren las FQ y TMP porque erradican los mismos de los reservorios (intestino, vagina y uretra) con lo que disminuyen las recurrencias.

Después de 48 horas de defervescencia de la fiebre, el tratamiento puede seguirse por vía oral (V.O)

El laboratorio ■ patricia oviedo

Un diagnóstico microbiológico de infección de las vías urinarias, es fundamental para el manejo clínico de la misma. Caracterizar correctamente el cuadro de infección del tracto urinario (ITU), nos posibilita identificar los cuadros de una ITU no complicada de una ITU complicada y de bacteriuria asintomática (BA).

Cuando no existe obstrucción del flujo urinario o factores predisponentes que pueden conducir al fracaso del tratamiento, podemos decir que estamos en presencia de una ITU no complicada.

La ITU en mujeres embarazadas, en posmenopáusicas, en gerontes e institucionalizadas, en pacientes con cálculos renales, son consideradas ITU complicadas.

Sin embargo no es sencillo establecer la línea de separación entre ellas, de lograrlo, disminuimos el tiempo de recuperación y aseguramos la adecuada conducta terapéutica.

De esta manera se puede evitar tanto el sobrediagnóstico como el subdiagnóstico. Ambos casos conllevan riesgos.

Un sobrediagnóstico puede implicar el uso inadecuado de antimicrobianos, la aplicación de técnicas invasivas como la cistouretrografía al primer episodio o una mala categorización del paciente al clasificar la presencia de infecciones urinarias a repetición en forma ficticia.

Un subdiagnóstico puede provocar soslayar infecciones urinarias altas en lactantes o un daño renal futuro por un diagnóstico tardío.

Diversos estudios refieren una baja asociación entre presencia de bacterias en orina (bacteriuria significativa) y síntomas clínicos de ITU, por lo que se recomienda para confirmar diagnostico realizar un cultivo de orina: el urocultivo.

El diagnóstico de infección de las vías urinarias a través del cultivo es un diagnóstico de probabilidad, por lo que en la valoración del mismo es de fundamental importancia contar con una muestra bacteriológicamente confiable.

La orina es normalmente un fluido estéril con posibilidad de contaminación con bacterias presentes en la uretra distal, piel, perineo, próstata, uretra o vagina

Sin embargo, el error diagnóstico más frecuente es la interpretación equivocada de los resultados de los exámenes de orina por una recolección inadecuada de la muestra o por una demora excesiva en el traslado al laboratorio para su procesamiento.

Causales de falsos positivos y negativos en el diagnóstico de ITU

Falsos Positivos

- Por fallas en el Transporte
  * Demoras en el envío al laboratorio
- Por fallas en el Conservación
  * Orina no refrigerada.
- Por fallas en el Procesamiento
  * Siembra tardía, lo que lleva a multiplicación del contenido bacteriano producto del arrastre.
  * Errores de laboratorio.
- Por fallas en la Higiene
  * Contaminación con secreción vulvovaginal
  * Contaminación con antisépticos utilizados.

Falsos Negativos

- Por falla en la Toma de muestra
  * Insuficiente retención, menor a las tres horas.
- Por fallas en la Dieta
  * Tratamiento antimicrobiano previo.
  * Por ingesta de líquidos en exceso. Baja densidad urinaria (< 1003).
  * Por ingesta de jugos cítricos, 12 horas antes.
    » Orinas con pH muy bajo o muy elevado (pH < 5; pH > 8,5).
- Por fallas en la Higiene

* "Arrastre" de antisépticos utilizados en la higiene.
- Por fallas en el Procedimiento
  * Fallas en la elección del medio de cultivo
  * Microorganismos exigentes que requieren métodos especiales.

Técnicas de recolección de las muestras de orina para el diagnóstico microbiológico

Con excepción de la muestra de orina obtenida por punción suprapúbica (PSP), las diferentes tomas de muestras, presentan el problema de diferenciar contaminación (por arrastre de las bacterias de la uretra) de infección.

> Orina obtenida por chorro medio

Es la técnica de recolección recomendada para niños y adultos que controlan esfínteres. Consiste en descartar la primera porción de la orina (10 ml), recolectar la segunda porción en un frasco estéril con tapa a rosca (10-20 ml) y eliminar la tercera porción, por ello se llama técnica del chorro medio.

Preferentemente se debe obtener la primera orina de la mañana lo que permite un adecuado recuento de bacterias evitando dar valor a una posible contaminación, indicando al paciente que vacíe su vejiga antes de acostarse.

De no ser posible una retención prolongada o cuando la clínica lo impone, recoger la orina con un tiempo de retención mínimo de tres horas.

En el caso de mujeres se recomienda el lavado de los genitales externos con agua y jabón neutro, de adelante hacia atrás, utilizar toalla limpia para el secado, con colocación de tapón vaginal (torunda de gasa o algodón)

En el caso de los hombres, lavado con agua y jabón neutro de la zona balanoprepucial y glande y orinar con prepucio retraído, secar con toalla limpia.

Para ambos sexos se debe recomendar que no utilicen antisépticos, ya que pueden afectar el resultado, provocando un descenso en el recuento de colonias.

> Orina obtenida por micción al acecho

Es muy similar al método de "orina obtenida por chorro medio", la dificultad radica en que el operador desconoce el momento preciso en el cual se producirá la micción; razón por la cual deberá estar atento al momento en que se produzca para recolectar la muestra en frasco estéril.

En el caso de los bebés, se debe indicar al acompañante del niño que debe concurrir al laboratorio provisto de una mamadera con el líquido que acostumbra a ingerir.

La hora de concurrencia al laboratorio dependerá del ritmo miccional del niño.

Se retiran los pañales y se lava la zona anal y perianal con agua y jabón, de inmediato enjuagar con agua hervida y enfriada.

En la niña el lavado se efectuará de adelante hacia atrás ubicándola en posición "ginecológica". Luego se la coloca en posición inclinada, parcialmente sentada mientras se mantienen los miembros inferiores en abducción, de tal manera que el chorro miccional no se deslice por la cara interna de los muslos.

Es conveniente que después de efectuada la higiene, se administre alguna clase de líquido para facilitar la diuresis.

Se prepara el recipiente estéril (con la tapa semicerrada) para poder ser abierto sin mayores dificultades en el momento que el bebé comienza a orinar.

Se descarta el primer chorro y se recolecta la segunda porción de la muestra.

Conviene cambiar el frasco cada 30 minutos, si se lo mantiene abierto.

Se deben solicitar dos muestras en un plazo no mayor de 24 horas, para evitar falsos diagnósticos, dada la frecuencia de hallazgos discordantes entre el sedimento y cultivo en el estudio bacteriológico de la infección urinaria del lactante.

No se debe aceptar el uso de bolsitas colectoras para los lactantes, dado que se obtiene un elevado número de falsos positivos (contaminaciones) por la vecindad con la zona anal y además por desconocer cuantas micciones se recolectan.

Este método de recolección al acecho presenta una importante frecuencia de contaminaciones (aproximadamente del 20%), aunque menor que con las bolsitas recolectoras (aproximadamente del 60%), dependiendo del operador y de la colaboración del paciente. Es una técnica que re-

quiere de cuidados y con frecuencia es difícil de efectuar. La ventaja es que es un procedimiento que no implica riesgo para el paciente.

> Orina obtenida por cateterismo

Esta forma de recolección se considera una alternativa a la punción vesical pero es también un procedimiento invasivo y puede generar arrastre retrógrado de microorganismos.

El simple cateterismo transuretral de la vejiga acarrea un riesgo leve, pero definido de originar bacteriuria iatrogénica (riesgo que se estima entre el 1 y 5 % de los pacientes en general y hasta del 20% en mujeres hospitalizadas), siendo mayor en pacientes diabéticos, ancianos o con alguna alteración inmunológica.

Esta práctica se considera riesgosa por el peligro de infección ascendente (hacia la vejiga) o bien por permitir el desarrollo bacteriano a nivel de la uretra posterior (habitualmente estéril).

Por otra parte, es un método con una baja frecuencia de contaminaciones (menor al 10%).

Esta técnica debe ser cuidadosa, aséptica y efectuada por personal capacitado.

Para efectuarla se desinfecta la zona perianal, se introduce la sonda por la uretra y se recoge, en un recipiente estéril, la porción media de la orina.

Este método de recolección suele ser útil en pacientes obesas o con sangrado vaginal o en aquellos pacientes en los que no es posible recoger adecuadamente el chorro medio de la orina por micción espontánea.

De igual modo puede obtenerse muestras a partir de ureterostomías, nefrostomías o vesicostomías.

En estos casos:

- Dejar fluir la orina retenida en la boca del conducto
- Limpiar la boca del conducto con un hisopo humedecido en alcohol
- Introducir un catéter en el conducto
- Permitir el drenaje de la orina y
- Recoger la parte media del chorro en recipiente estéril.

Este último método de recolección es de elección en pacientes con cateterismo intermitente

> Orina obtenida por punción de sonda

En el paciente sondado, la muestra debe ser tomada preferentemente por punción suprapúbica (PSP).

Es importante tener en cuenta que jamás se debe recolectar orina del extremo de una sonda que no ha sido recién colocada ni remitir para el análisis la punta de la sonda vesical, ya que generalmente las sondas vesicales están colonizadas a las 48 horas de instaladas y los microorganismos aislados no necesariamente son los causantes de la infección urinaria.

En este método de recolección:

- Desinfectar previamente la superficie de la zona de la sonda donde se realizará la punción (aproximadamente a unos 10 cm del meato) con povidona-yodo o clorhexidina.
- Deja secar
- Volver a limpiar la zona con solución fisiológica estéril.
- Luego de la higiene de la zona, punzar la sonda con aguja y jeringa estéril
- Aspirar la orina (punción-aspiración).

Si bien antes era indicado, actualmente se recomienda no pinzar la sonda para la toma de muestra.

Cuando la sonda se retira por algún motivo (tiempo de permanencia, infección, etc.) y se coloca una nueva, es conveniente efectuar el estudio inmediatamente de colocada la misma.

En este único caso, la muestra puede obtenerse por el drenaje de la sonda cuidando de que no toque los bordes del recipiente. Luego se procede de manera similar a la metodología descrita.

La ventaja de este método es que no presenta riesgos para el paciente.

Su rendimiento es comparable, en un 90%, con la punción vesical.

> Orina obtenida por punción suprapúbica (PSP)

Este método de confirmación diagnóstica está indicado en cualquier tipo de pacientes, en especial neonatos y lactantes graves cuando:

- hay dudas en el diagnóstico o resultados contradictorios en distintas tomas de muestras previas por micción espontánea.
- se sospecha infección por microorganismos exigentes, bacterias anaerobias o por *Cándida* spp.

- es también útil para confirmar el diagnóstico de infección urinaria por microorganismos habitualmente contaminantes de piel y mucosas.

Las ventajas de este método son:

- se obtiene directamente orina vesical,
- permite sembrar la orina en medio líquido y así poner de manifiesto gérmenes que se encuentran en baja concentración,
- solo puede contaminarse con gérmenes de piel (menos del 0,1%) o de intestino por atravesar un asa,
- es la única metodología válida para la investigación de bacterias anaerobias en la orina.

La precaución que se debe tomar siempre que se considere esta técnica, es el llenado vesical, detectable por percusión abdominal infraumbilical. De esta manera los riesgos de fracaso son mínimos, como así también cualquier complicación derivada de la punción de una vejiga con escasa cantidad de orina.

A pesar de sus ventajas, esta técnica está contraindicada en:

- pacientes con infecciones de piel en la zona perineal o abdominal, y
- pacientes con tumores.

El transporte y la conservación de la muestra

Toda muestra debe llevar los datos filiatorios del paciente y estar acompañada de un formulario y/o recetario médico donde se indique:

- nombre, edad y sexo del paciente
- si es mujer, indicar la presencia de embarazo.
- existencia de patología de la vía urinaria
- método empleado en la recolección de la muestra
- diagnóstico clínico
- uso previo de antimicrobianos
- hora de obtención de la muestra

ya que esta información es fundamental para el procesamiento, la interpretación de los resultados y la elección de los antimicrobianos a ensayar.

La orina es un buen medio de cultivo que permite la multiplicación de los microorganismos incrementando el recuento bacteriano, por lo que las muestras recolectadas (con cualquiera de los métodos descriptos) deberán

ser refrigeradas de inmediato colocado el frasco o la jeringa con aguja protegida (en el caso de punción de sonda vesical o PSP) en heladera entre 4ºC y 8ºC (nunca en congelador), hasta que se procesan.

Si la orina debe transportarse a distancia, puede disponerse de un recipiente de material aislante en el que se colocará el frasco, manteniéndolo refrigerado.

Solo para la PSP la refrigeración, aunque conveniente, no es absolutamente necesaria como en los casos anteriormente descritos.

Si no es factible el procesamiento inmediato, las muestras pueden mantenerse refrigeradas (4°C- 8ºC) durante 24 horas sin que se altere el recuento bacteriano.

En caso de tener evidencias de ausencia de refrigeración de la orina, ó cuando el tiempo ó método de recolección no ha sido cumplido según las indicaciones del laboratorio, se debe solicitar nueva muestra.

Procesamiento de las muestras

El procesamiento del urocultivo demora por lo menos entre 48 a 72 horas.

Un análisis adecuado debe, además, incluir la determinación del pH y la densidad de la orina así como el estudio del sedimento.

Debemos recordar que no existe ningún método rápido que reemplace el estudio del sedimento en orina.

La presencia de algunos elementos como bacterias en la coloración de Gram, leucocituria, piuria o cilindros leucocitarios en el examen de orina son sugerentes de una infección urinaria.

Por ejemplo se ha descrito que hasta 10% de niños con fiebre sin infección urinaria presentaban leucocituria y que, por otra parte, hasta 50% de los niños con infección urinaria con cultivo positivo presentaban sedimento urinario normal.

> Determinación de caracteres fisicoquímicos

Todo examen bacteriológico debe incluir examen macroscópico (olor, color, aspecto), pH, densidad y proteínas.

Valores elevados de pH se encuentran a menudo en infecciones por gérmenes que desdoblan la urea, como *Proteus.*

Staphylococcus spp., *Pseudomonas* spp., y *Klebsiella* spp., también alcalinizan la orina.

Es importante la determinación del pH porque puede influir en la elección del agente antimicrobiano, ya que la actividad de algunos de ellos lo pueden modificar

Tener en cuenta que tanto un pH bajo (< 5) como un pH elevado (> 8) dificultan la reproducción bacteriana.

Otro dato de importancia es la densidad de la orina.

Valores inferiores a 1003 podrían dar resultados falsos negativos debido a la escasez de nutrientes para el desarrollo microbiano.

> Estudio del sedimento

La sospecha de ITU es relevante y fundamental para la interpretación del urocultivo.

La presencia de bacterias, leucocitos y otros elementos indican claramente la bacteriuria y la respuesta del huésped.

El estudio del sedimento tiene gran valor para establecer, unido a la clínica, un grado razonable de sospecha de infección urinaria.

La presencia de piuria tiene una alta sensibilidad (95%) pero una relativamente baja especificidad (70%). El término "piocito" denominado así por las características morfológicas de los leucocitos, si apoya la sospecha de una ITU.

La presencia de bacterias al realizar el examen microscópico directo de orina no centrifugada, es sensible para detectar altos recuentos de colonias (> 10^5 UFC), pero la sensibilidad disminuye en ITU con menores recuentos de colonias.

Esta sensibilidad y especificidad, depende de ciertos factores como el tipo de muestra, tiempo de retención, el sexo y edad del paciente y la presencia de otras patologías.

Se considera piuria ó leucocituria patológica (respuesta inflamatoria positiva) la presencia de 5 o más leucocitos por campo microscópico en observación con aumento de 400X, en el sedimento urinario.

Una limitación del análisis del sedimento urinario es que depende del operador, por lo que es necesario un entrenamiento adecuado en las prácticas de observación microscópicas.

Para la realización del examen del sedimento se debe previamente:

- Homogeneizar la orina con agitación suave

- Centrifugar aproximadamente 10 ml en tubo cónico a 2000 r.p.m. durante 10 minutos, o a 2500 r.p.m. durante 5 minutos.
- Volcar el sobrenadante
- Observar microscópicamente el sedimento entre porta y cubreobjeto con aumento de 400X.

En este estudio, observar la presencia o no de leucocitos, eritrocitos y/o cilindros. También se puede realizar una estimación de la presencia o no gérmenes. La presencia de células descamativas y/o mucus en una paciente mujer, sugiere que la muestra está contaminada con secreción vaginal.

> Coloración de Gram de Orina Total

Esta observación se efectúa en una gota de orina sin sedimentar.

Una bacteriuria de 10^5 UFC/ml puede predecirse con un 90% de probabilidad, al observar en un frotis coloreado por Gram, de orina bien mezclada sin centrifugar, 2 (dos) o más bacterias por campo microscópico 1000X.

Esta información es un importante aporte al tratamiento empírico inmediato, en especial en pacientes internados.

Está también indicada en: pacientes que están recibiendo antimicrobianos, pacientes que presentan sedimento patológico con cultivos negativos (para verificar la presencia de microorganismos exigentes) y pacientes con sepsis de punto de partida urinario.

Sin embargo este procedimiento carece de sensibilidad, ya que actualmente se sabe que muchas infecciones urinarias cursan con un recuento de colonias inferior a 10^5 UFC/ml.

La presencia de numerosas células epiteliales escamosas y diferentes morfotipos microbianos indica frecuentemente contaminación, por lo que se debería solicitar una nueva muestra.

> Métodos Rápidos de Diagnóstico

En los últimos años diversas líneas de investigación se han desarrollado de manera de lograr de forma rápida un diagnóstico presuntivo de ITU. Las más empleadas son las técnicas de bioluminiscencia y citometría.

Cuando el recuento es igual o superior a 10^5 UFC/ml observamos una buena correlación, para recuentos menores, los resultados obtenidos no son los esperados, motivo por el cual no son muy utilizadas.

La técnica de Bioluminiscencia, tiene como fundamento la detección del ATP bacteriano en presencia del sistema enzimático luciferin-luciferasa con emisión de luz, como revelador de una prueba positiva. Posee buena sensibilidad pero baja especificidad, al no tener la capacidad de distinguir el origen del ATP (leucocitos y otras células).

Detectar microorganismos en orina independientemente de su número y viabilidad, se puede lograr con la técnica de Citometría de flujo, el inconveniente en la interferencia que producen ciertas sustancias presentes en la orina, por lo que no se recomienda su empleo en orinas con gran turbidez o hematúricas.

> Siembra de la muestra

La siembra debe realizarse a partir de la orina sin centrifugar con el método elegido para la realización del recuento bacteriano (ansa calibrada o dilución).

Para la elección del medio de cultivo es necesario recordar que el 70 – 80 % de las muestras enviadas al laboratorio para urocultivo son negativas, que el 85 – 90 % de las infecciones urinarias son producidas por enterobacterias y que entre los microorganismos bacterianos grampositivos, los más frecuentes son los *Staphylococcus* spp., y *Enterococcus* spp.

Si se sospecha infección por cocos grampositivos no enterococos, o una cistitis incrustante por *Corynebacteruim urealyticum*, la muestra debe ser sembrada en medios enriquecidos como el agar sangre.

Ante la sospecha de una infección por *Haemophilus* spp., la muestra deberá ser sembrada en agar chocolate.

Para los bacilos gramnegativos se aconseja usar un medio lactosado con indicador de pH y que inhiba el crecimiento invasor de algunos *Proteus* spp.

El medio de cultivo más utilizado es el agar CLDE (cistina-lactosa deficiente en electrolitos) ya que, además de poseer las condiciones antes descriptas, permite el desarrollo de bacilos gramnegativos, *Staphylococcus* spp., y *Enterococcus* spp.

En caso de utilizar otros medios lactosados como el agar EMB Levine (Eosina Azul de Metileno conteniendo solo lactosa) o agar Mac Conkey,

que inhibe el desarrollo de los cocos grampositivos, siempre se debe sembrar en forma paralela una placa conteniendo un medio de cultivo no inhibidor, como agar nutritivo, agar tripticasa soya o agar Mueller Hinton, entre otros.

En embarazadas deben incluirse además, medios de cultivo específicos, agar sangre con colistina-nalidíxico para el aislamiento de *Streptococcus agalactiae*. La presencia de *S. agalactiae* en muestras de orina de gestantes siempre debe ser valorada ya que es indicativa de un alto grado de colonización vaginal que representa un factor de riesgo de infección neonatal.

Los medios cromogénicos, se vienen utilizando en los últimos años, estos medios incluyen en su composición compuestos cromógenos que son sustratos de enzimas específicas. El sustrato cromogénico es degradado por estas enzimas, produciéndose una molécula coloreada. Cultivos polimicrobianos son favorecidos en mayor proporción dada la facilidad de diferenciación de colonias distintas. Siendo esta la ventaja más evidente con respecto al CLDE los medios cromogénicos no superan la capacidad de recuperación del CLDE.

Con la finalidad de un proceso de siembra racional, comparando costo-beneficio elaboramos el presente:

Esquema de Siembra de acuerdo a la característica del sedimento urinario

- Sedimento normal y ausencia de microorganismos:
  * Media placa de CLDE.
- Sedimento patológico y ausencia de microorganismos:
  * Media placa de agar sangre o chocolate y media de cromogénico, CLDE, EMB o Agar Mac Conkey.
- Bacilos Gram Negativos con independencia del sedimento:
  * Placa entera de CLDE, medio cromogénico, EMB o Agar Mac Conkey.
- Cocos Gram Positivos con independencia del sedimento:
  * Placa entera de agar sangre o chocolate.
- Embarazadas
  * Seguir las indicaciones anteriores y agregar placa entera de agar sangre con colistina-nalidíxico para el aislamiento de *Streptococcus agalactiae*.
- Población microbiana mixta:
  * Placa entera de medio cromogénico.

> Recuento de colonias

El recuento de colonias tiene por finalidad calcular el número de colonias existentes por mililitro de orina.

El dato que se obtiene no es determinante, pues debe correlacionarse con las manifestaciones clínicas del paciente, el diagnóstico presuntivo, el tipo de microorganismo aislado, la presencia o no de respuesta inflamatoria, la concentración de la orina, el tratamiento antimicrobiano y/o medicamentoso que recibe el paciente y la técnica de recolección, entre otros factores a considerar.

Existen varios métodos para realizarlo y la elección de uno u otro depende de la disponibilidad del laboratorio y del entrenamiento del operador.

a. Método de la dilución en tubos

   Para realizar este método, considerado "clásico" y de mayor precisión, se diluye la orina (1/10- 1/100, etc) en solución fisiológica estéril, se siembra una alícuota (0,1 ml) en el medio de cultivo a utilizar y se disemina con espátula de Drygalski.

   Luego de la incubación, se cuentan las colonias y se multiplica por la dilución efectuada a fin de obtener el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por ml.

b. Método del ansa calibrada

   Luego de homogenizar la muestra, se la siembra con un ansa calibrada en el medio de cultivo a utilizar por el método utilizado para recuento microbiano.

Tener en cuenta el calibre del ansa dado por el fabricante para calcular el factor de dilución.

En general la carga del ansa es de 5 microlitros, por lo que cada colonia que aparece en la placa corresponde a 200 UFC/ml, factor por el que hay que multiplicar el número de colonias contadas a fin de obtener el número de UFC por ml presente en la muestra.

Es conveniente utilizar el ansa calibrada solo para la siembra de urocultivos y recordar que aproximadamente cada 300 orinas sembradas, el ansa debería cambiarse a fin de mantener el calibre de la misma.

Los recuentos bacterianos una vez calculados según el número de colonias obtenidas por ml de orina se deben informar en forma de rangos ($< 10^3$, entre 10^3-10^4, $> 10^5$, etc) y no con números exactos (Ej: 23400 UFC/ml).

Luego de procesadas, se recomienda guardar las muestras de orina refrigeradas hasta obtener el resultado del cultivo.

Así, en caso de resultados discordantes se podrá recurrir a la muestra original almacenada para repetir los análisis.

> Incubación de las placas

Dado que la mayoría de los patógenos urinarios son facultativos, la atmósfera de incubación utilizada es la aeróbica, excepto si se incluyen placas de agar sangre o chocolate, las que se recomienda incubarlas con 5-7% de CO_2 (método alternativo algodón humedecido con agua, vela encendida en recipiente de cierre hermético).

La temperatura de incubación (excepto en casos que se sospeche alguna micosis) debe realizarse a 35 ºC.

El tiempo de incubación recomendado es de 72 horas, antes de descartar las placas como "negativas".

> Interpretación de los cultivos

La interpretación del cultivo debe realizarse conjuntamente con la valoración de los datos previamente comentados- del paciente (clínica, edad, sexo, enfermedad de base) -, de la muestra (sedimento, pH, densidad) - del desarrollo microbiano como recuento de colonias, características y número de cepas aisladas, a fin de asociar el o los aislados con un proceso infeccioso.

Para interpretar los resultados tener en cuenta la frecuencia de las infecciones polimicrobianas, que se producen habitualmente en enfermos sometidos a cateterismos o a ciertos tipos de tratamientos invasivos.

No olvidar que las infecciones monomicrobianas representan más del 95% y dentro de éstas, las causadas por enterobacterias ocupan un lugar de privilegio.

Tabla 1. Interpretación del episodio según recuento de colonias bacterianas, síntomas y hallazgos en el sedimento urinario

Recuento (UFC/ml)	Síntomas y/o Leucocituria	Interpretación
$>10^3$	Presentes	Infección urinaria
$>= 10^5$	Ausentes	Bacteriuria asintomática
10^3 - 10^4	Ausentes	Repetir estudio
10^2 – 10^3	Ausentes	Posible contaminación

Fuente: Levy Hara G, Lopardo G. Consenso argentino intersociedades para el manejo de la infección del tracto urinario.

Recordar que:

El término bacteriuria asintomática implica:

- Dos cultivos positivos con recuento de colonias superior o igual a 10^5 UFC/ml del mismo microorganismo, sin síntomas clínicos de infección urinaria y sin respuesta inflamatoria o sedimento normal, indican con un 95% de probabilidad que se trate de una verdadera bacteriuria asintomática, mientras que un solo cultivo con estas características sólo la indica con un 80% de probabilidad.
- En embarazadas, independientemente del sedimento urinario, una sola muestra de chorro medio con un recuento de colonias superior o igual a 10^5 UFC/ml y desarrollo de un solo germen, debe ser estudiada por el riesgo que implica para la paciente (pielonefritis) y/o para el desarrollo normal del embarazo (parto pretérmino o bajo peso del niño al nacer) .

  El tratamiento se deberá realizar según la información que aporte el estudio microbiológico y los controles con un urocultivo en la segunda semana post-tratamiento y luego uno mensual hasta final del embarazo.

  Es importante recordar que toda embarazada presenta leucorrea fisiológica, por ello el uso del tapón vaginal es imprescindible.

> a- Cultivos monomicrobianos

En pacientes adultos se deben valorar los síntomas, el sedimento y el recuento de colonias.

Cuando se aplica el criterio tradicional, donde se considera un cultivo positivo cuando el recuento de colonias es superior o igual a 10^5 UFC/ml, la especificidad es alta pero la sensibilidad es solo del 50%.

Actualmente, se consideran otros valores de recuento, los que varían según el tipo de pacientes.

En pacientes adultos de cualquier sexo, un recuento mayor o igual a 10^3UFC/ml con respuesta inflamatoria positiva implica una bacteriuria significativa.

En ausencia de respuesta inflamatoria, solo un recuento mayor o igual a 10^5 podría significar una bacteriuria significativa probable.

En este caso se debe informar la especie bacteriana aislada, el antibiograma correspondiente y consignar a modo de observación, que llama la atención la escasa reacción inflamatoria.

En pacientes sondados un cultivo con un recuento mayor a 10^2 UFC/ml, independientemente de la respuesta inflamatoria, debería ser estudiado.

En pacientes pediátricos se debe considerar que aproximadamente un 40% de las infecciones urinarias, incluyendo las adquiridas en el hospital, cursan sin signos ni síntomas específicos.

Algunos autores sugieren que una vez identificada una bacteriuria asintomática debe ser verificada con un segundo cultivo especialmente en niños menores de 5 años.

En niños, y en especial en todo paciente que no controla esfínteres, es conveniente solicitar siempre dos muestras, las que se deben evaluar simultáneamente.

La interpretación de los recuentos en cultivos de orina de pacientes pediátricos varían según el sexo de los mismos y la forma de recolección de la muestra.

Para las niñas, en muestras obtenidas por la técnica del chorro medio, se considera que un recuento mayor o igual a 10^5 UFC/ml podría significar una bacteriuria significativa probable si se interpreta el recuento de una sola muestra, y una bacteriuria significativa verdadera si se lo interpreta en dos muestras.

Los recuentos entre 10^4-10^5 UFC/ml obligan a solicitar nuevas muestras, mientras que los recuentos inferiores a 10^4 UFC/ml no son significativos.

Para los niños, en muestras obtenidas por la técnica del chorro medio, se considera que un recuento mayor o igual a 10^4UFC/ml implica una bacteriuria significativa verdadera cualquiera sea el número de muestras interpretadas.

Los recuentos entre 10^3-10^4 UFC/ml obligan a solicitar nuevas muestras.

Los recuentos inferiores a 10^3 UFC/ml *no son significativos.*

Criterios de interpretación de los cultivos de pacientes pediátricos

Método de Recolección	Recuento Microbiano	Probabilidad de IU
Punción suprapúbica	BGN cualquier recuento/ GP > 10^3 UFC/ml	>99 %
Cateterización	> 10^5 UFC/ml	95 %
	10^4 UFC/ml - 10^5 UFC/ml	Probable
	10^3 UFC/ml – 10^4 UFC/ml	Repetir
Chorro medio (masculino)	> 10^4 UFC/ml	Probable
	<10^3 UFC/ml	Improbable
Chorro medio (femenino	tres muestras > 10^5 UFC/ml	95 %
	dos muestras > 10^5 UFC/ml	90 %
	una muestra > 10^5 UFC/ml	80 %
	5 x 10^4 – 10^5 UFC/ml	Repetir
	10^4 – 5 x 10^5 UFC/ml (sint)[3]	Repetir
	10^4 – 5 x 10^4 UFC/ml (asint)[4]	Improbable
	10^4 UFC/ml	Improbable

(sint)[3]: niñas sintomáticas. (asint)[4]: niñas asintomáticas. Fuente: Lopardo H. Urocultivo, Criterios de interpretación e Informe. Ap. de Lab. Vol III. 2010.

Estos valores se modifican si la muestra fue obtenida por sondaje.

Tanto para las niñas como para los niños, en muestras obtenidas por sondaje, un recuento mayor o igual a 10^5 UFC/ml implica una bacteriuria significativa verdadera y un recuento de 10^4-10^5 UFC/ml una probable bacteriuria significativa, debiendo solicitarse nuevas muestras en caso de recuentos de entre 10^3- 10^4 UFC/ml.

Los recuentos inferiores a 10^3 UFC/ml no son significativos.

En neonatos, la mejor muestra (goldstandard) es la PSP.

Como muestras opcionales se encuentran la orina obtenida por sonda uretral o la orina obtenida al acecho. Esta última opción tiene valor solo si el cultivo es negativo.

Si la muestra del neonato fue obtenida por PSP, el desarrollo de bacilos gramnegativos o levaduras es significativo cualquiera sea el recuento.

Si se trata de cocos grampositivos, se considera significativo un recuento mayor a 10^3 UFC/ml.

Si la muestra fue obtenida por sondaje uretral, un recuento mayor a 10^4 UFC/ml implica una bacteriuria significativa.

Los recuentos entre 10^3- 10^4 UFC/ml obligan a solicitar nueva muestra. Recuentos inferiores a 10^3 no son significativos.

> b- Cultivo polimicrobiano

Al hablar de cultivo polimicrobiano de orina, se hace referencia a la presencia de 2 o más microorganismos, en recuentos mayores de 10^5 UFC/ml y en proporciones similares.

El predominio de un solo tipo de microorganismo en una muestra en proporción del 90% debe asumirse como monomicrobiano. La infección mixta, es extremadamente infrecuente (<0,3%) en pacientes ambulatorios no sondados. Recordar que una infección mixta infiere la presencia de un factor urológico predisponente.

Esta infección es más prevalente en los pacientes internados sondados y en algunos enfermos con determinadas patologías que afectan al tracto urinario.

Por lo tanto, toda infección polimicrobiana debería documentarse con al menos el estudio de dos muestras. La ausencia de reacción inflamatoria siempre debería despertar la sospecha de una probable contaminación.

O sea, la ITU polimicrobiana significativa podría ser asumida como tal, si se documenta la presencia de dos o más microorganismos en igual proporción, en dos tomas de orina correctamente recolectadas y donde se observe sedimento patológico

Identificación de los aislamientos:

La identificación del patógeno recuperado en el estudio bacteriológico de una infección urinaria es fundamental para el seguimiento del paciente (para definir por ejemplo, persistencia o reinfección).
Las colonias desarrolladas deberán ser estudiadas por pruebas bioquímicas basadas en la investigación de productos del metabolismo del patógeno que actúan sobre diferentes sustratos.
De disponerse, se realizará la tipificación serológica.

El laboratorio debe adaptar su esquema de tipificación de acuerdo a sus necesidades y posibilidades, tratando de que sea lo más completo posible a fin de asegurar una correcta identificación.

> Susceptibilidad de los aislamientos a antimicrobianos

Ante un cultivo significativo y la conveniencia de continuar con el estudio bacteriológico deberá efectuarse la determinación de la sensibilidad de la cepa aislada, no olvidando que en casos excepcionales de ITU mixtas, deberá identificarse y estudiarse la sensibilidad de cada cepa por separado.

Para tal fin, resulta suficiente en la mayoría de los casos, el ensayo de difusión en agar con discos de antimicrobianos (método de Kirby-Bauer). (ver **Capítulo 9**).

El laboratorista debe recordar que lo importante es ensayar e informar los antimicrobianos de elección para el tratamiento de las infecciones de las vías urinarias, los que son apropiados para las distintas especies y según las características del paciente.

Esto nos lleva a ser estrictos en la elección de los antimicrobianos que se van a ensayar:

- los antimicrobianos deberán presentar eliminación activa por orina,
- ser activos a pH habitual de orina (5,5-7,0),
- alcanzar significativa concentración en el parénquima renal,
- presentar baja nefrotoxicidad y escasas reacciones secundarias.

La selección de los antimicrobianos debería hacerse:

- Según las características de cada paciente (por lo que es fundamental la comunicación con el médico tratante), ya que por ejemplo en embarazadas no se debería incluir la sensibilidad a quinolonas, cotrimoxazol (TMS) o nitrofurantoína (según el trimestre del embarazo).
  En niños (excepto en situaciones excepcionales) no se deberían informar quinolonas.
- Según la especie bacteriana, ya que no se debería incluir ni informar un antimicrobiano frente a una especie que es naturalmente resistente al mismo. Por ejemplo: *Proteus* spp., naturalmente resistente a colistín y nitrofuranos, bacilos gramnegativos naturalmente resistentes a penicilinas, meticilina, lincomicina, entre otros.

Por otra parte, es necesario tener en cuenta que los antimicrobianos que se ensayan no son los mismos según estemos estudiando una enterobacteria, un Bacilo gramnegativo No Fermentador (BNF), un estafilococo o un enterococo.

ver capítulo 9.

También es necesario considerar que algunos antimicrobianos se ensayan para vigilancia epidemiológica pero no se informan de existir otras posibilidades terapéuticas. Por ejemplo los glucopéptidos (vancomicina, teicoplanina) frente a enterococos ó frente a estafilococos meticilino sensibles.

> Informe de los resultados de los cultivos

El informe del laboratorio debería ser adecuado y oportuno en tiempo y forma a fin de que colabore con el diagnóstico y no produzca confusiones.

Tanto un diagnóstico microbiológico con escasa información no va acompañado de rentabilidad clínica, pudiendo muchas veces confundir al médico, demorar tratamientos o provocar otros innecesarios.

Los primeros informes, aunque provisorios, tienen gran importancia para el clínico porque permiten adecuar los tratamientos empíricos.

El informe de urocultivo debe contener, todos los estudios detallados anteriormente sobre recolección de la muestra, Gram de orina total, sedimento, cultivo y identificación del microorganismo, recuento y su sensibilidad a antimicrobianos.

Un aspecto de gran importancia en el informe es el agregado de observaciones, las cuales muchas veces son más importantes que el informe en sí.

Por ejemplo, “muestra probablemente contaminada”, “llama la atención la ausencia de respuesta inflamatoria”, “se solicita nueva muestra para confirmar el diagnóstico”, etc.

> Situaciones especiales

Staphylococcus saprohyticus: es el segundo microorganismo causante de infecciones urinarias en mujeres jóvenes, por lo que hay que tenerlo en

cuenta y no descartarlo como un contaminante de la piel, en especial si se presenta en un recuento bajo. Recordar que es un estafilococo coagulasa negativo por lo que se hace imprescindible realizar una identificación mínima a fin de diferenciarlo de otros estafilococos coagulasa negativos que infrecuentemente causan infecciones urinarias.

Proteus mirabilis: en niños mayores y hombres adultos aumenta su prevalencia como agente etiológico de infecciones urinarias, en especial asociado a complicaciones ureolíticas (cálculos). Recordar que por su capacidad de hidrolizar la urea, aumenta el pH de la orina, por lo que su aislamiento en orinas de pH ácido, indican muy probablemente una contaminación (es flora habitual de prepucio) siendo necesario en caso de respuesta inflamatoria positiva, reiterar la muestra.

Enterococcus spp.: se aíslan de pacientes internados, pacientes ambulatorios mayores de 60 años (especialmente hombres), transplantados renales y solo en el 10% de niños con una enfermedad de base, por lo que su aislamiento en niños sin esta condición indica muy probablemente una contaminación (a partir de heces) siendo necesario reiterar la muestra.

Streptococcus agalactiae: su asociación con infecciones del recién nacido hace imprescindible estudiarlos en muestras de orina de mujeres embarazadas de entre 35-37 semanas de gestación, por lo que se hace imprescindible sembrar la orina en agar sangre a fin de detectarlos. Su aislamiento en estas condiciones (independientemente del recuento y de la respuesta inflamatoria) debe ser informado de inmediato, ya que de esta manera el médico tratante podrá, en el momento del parto, establecer la Profilaxis Intra-Parto (PIP) adecuada, a fin de prevenir el riesgo de una infección perinatológica.

Corynebacterium urealyticum: es un patógeno reconocido del tracto urinario. La cistitis incrustante por *C. urealyticum* fue descrita en los ’80 siendo más frecuente en pacientes mayores de 65 años con anomalías predisponentes del tracto urinario, aunque puede presentarse en adultos jóvenes y niños con anomalías urológicas. Ante la observación de hematuria franca y pH elevado, se hace imprescindible sembrar la orina en agar sangre e incubar la placa hasta 72 horas (es una bacteria de desarrollo lento). Es característica su multirresistencia a los antimicrobianos.

Haemophilus influenzae; Streptococcus pneumoniae: Son agentes etiológicos de infecciones urinarias en niños, en especial *H. influenzae*, estando asociados a uropatías. En niños con respuesta inflamatoria positiva y sin desarrollo bacteriano en CLDE a las 24 horas de cultivo, se debe sembrar la muestra en agar chocolate a fin de detectar estos microorganismos.

Candida spp.: su presencia en orina siempre, independientemente del recuento, requiere una minuciosa evaluación clínico-microbiológica para determinar su participación como agente etiológico. Ante una respuesta inflamatoria negativa podría estar indicando solo colonización vesical. Son frecuentes en infecciones urinarias hospitalarias, en especial en sondados, diabéticos, inmunosuprimidos o pacientes sometidos a tratamientos antimicrobianos prolongados. En neonatos (candidiasis neonatal), la colonización por *Candida* spp., se estima que ocurre en el canal del parto, por el tracto digestivo, genital, de manos del personal (uñas del personal de salud que se someten a constantes lavados y desarrollan ornicomicosis).

La infección urinaria por *Candida* spp., en neonatos, es mayor cuanto menor es el peso al nacer. Los neonatos de menos de 1500 gramos al nacer tienen una colonización de más del 25% y el 8% desarrolla enfermedad invasiva, colonizando *Candida* spp., los accesos venosos centrales. Contribuye a ello, el apoyo de alimentación nutricional parenteral, el uso de antibióticos de amplio espectro y la intubación.

La candiduria, (diagnosticada en muestra correctamente tomada) se correlaciona con infección sistémica en un 50%. La meningitis por *Cándida* spp., aparece en el 60% de los casos de infección sistémica. Las pseudo-hifas deben ser jerarquizadas en orinas correctamente recolectadas. Conocer el peso del neonato y su vía de nacimiento, parto o cesárea, es de gran utilidad.

Si tenemos en cuenta la asociación infección urinaria bacteriana *versus* bacteriemia con infección urinaria por cándidas versus candidemia, la correlación es 8% versus 52%, respectivamente.

La orina es excelente para correlacionar con infección sistémica a *Cándida* spp. Debe informarse inmediatamente al neonatólogo que deberá buscar focos, encontrándose entre los principales los endovasculares.

En un neonato, tener en cuenta que si demoramos el diagnóstico o sub-diagnosticamos una infección, pueden quedar severas secuelas como cicatrices renales, y si sobre diagnosticamos, el paciente será internado, quedará en riesgo de adquirir una infección hospitalaria y será sometido a técnicas invasivas, además de recibir tratamientos indebidos. Por ello debemos ser cuidadosos en el diagnóstico del laboratorio que se inicia con la toma correcta de la muestra.

Conclusiones

Es importante considerar que no se puede hacer un diagnóstico correcto de una infección urinaria que permita implementar una terapéutica eficaz sin tener en cuenta al menos tres aspectos fundamentales:

- una correcta recolección,
- transporte y conservación de la orina,
- la identificación y el conocimiento del agente etiológico y,
- un informe adecuado y oportuno.

Además debemos recordar que, en especial en niños, solicitar nueva muestra implica la reiteración de una maniobra a veces dificultosa, un nuevo viaje al laboratorio u hospital con el correspondiente costo económico, el ausentismo del niño y/o de los padres o el retraso en una cirugía o cistouretrografía con el consiguiente riesgo de cicatrices renales si era una infección urinaria verdadera.

Bibliografía consultada

Achkar JM, Fries BC: "*Candida* infections of the genito urinary tract". *Clin Microbiol Rev*; 23: 253–273. 2010.

Wein, Alan; Kavoussi, Louis; Novick, Andrew; Partin, Alan; Peters, Graig; Walsh, Campbell: *Urología Andrología 1008*. Tomo I, 9ª edición, 2008.

Andreu, Domingo A; Cacho, J; Coira, Nieto A; Lepe, Jiménez JA: *Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario*. 2a ed. (14a) 2010.

Alados Arboledas JC, Gómez García de la Pedrosa E, Leiva León J, Pérez Sáenz JL, Rojo Molinero E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. 10a. Pérez Sáenz JL (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2014.

Andreu, Antonia; Alós, Juan Ignacio; Gobernado, Miguel; Marco, Francesc; de la Rosa, Manuel; García-Rodríguez, José Antonio. Etiología y sensibilidad a los antimicrobianos de los uropatógenos causantes de la infección urinaria baja adquirida en la comunidad.

Estudio nacional multicéntrico. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Volume 23, Issue 1, 2013.

Andreua A, Cacho J, Coirac A, Lepe J A. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. Enferm Infecc Microbiol Clin.; 29(1): 52–57. 2011.

Czaja CA, Stamm WE, Stapleton AE et al: "Prospective cohort study of microbial and inflammatory events immediately preceding *Escherichia coli* recurrent urinary tract infection in women". *J Infect Dis*; 200: 528-36. 2009.

Cecchini E (Ed). *Infectología y enfermedades infecciosas*. Ed. Ediciones Journal. 2007.

"Consenso Argentino Intersociedades para el Manejo de la Infección del Tracto Urinario". Parte II. *Rev Panam Infectol* 9(4): 50-64. 2007.

Casellas, José María: "Etiología (etiopatogenia) de las infecciones urinarias". En: www.villavicencio.org. ar/pdf08/150.pdf. Rosario.

Limansky, Adriana: INFECCIONES URINARIAS 2014. pdf - Facultad de Ciencias www.fbioyf.unr.edu.ar/

Chang JC, Chien MI, Chein HM, Yan JJ, Wu jj. Comparison of CPS ID3 and chromagar orientation chromogenic agars with standard biplate technique for culture of clinical urine samples. *J Microbiol Immunol Infect*. ; 41: 422-427. 2008.

Driscoll JA, Brody SL y Kollef MH. The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of Pseudomonas Aeruginosa Infections. Drugs 67(3): 351-368, 2007.

Lopardo, Horacio: *Urocultivo. Procesamiento, Criterios de interpretación e Informe. Apuntes de Laboratorio*. Volumen III. 2010.

Mori R, Yonemoto N, Fitzgerald A, Tullus K, Verrier-Jones K, Lakhanpaul M. *Diagnostic performance of urine dips-tick testing in children with suspected UTI: a systematic review of relationship with age and comparison with microscopy*. Acta Pediatr.; 99 (4): 581-584. 2010.

Muñoz-Algarra, M; Martinez-Ruiz, R; Orden-Martinez, B: *Evaluación del sistema automatizado UF-1000i en el diagnóstico de infección urinaria. Enferm Infecc Microbiol Clin.* Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc 2012.05.017. 2012.

Pieretti, B; Brunati, P; Pini, B; Colzani, C; Congedo, P; Rocchi, M; Terramocci, R. : Diagnosis of bacteriuria and leucocyturia by automated flor cytometry compared with urine culture. *J Clin Microbiol*; 48(11): 3990-3996. 2010.

Ramlakhan SL; Burke DP; Goldman RS: Dipstick urinalysis for the emergency department evaluation of urinary tract infections in infants aged less than 2 years. *Eur J Emerg Med*.; 18(4): 221-4. 2011.

Sociedad Argentina de Infectología (SADI), Sociedad Argentina de Urología (SAU), Sociedad Argentina de Medicina (SAM), Sociedad Argentina de Bacteriología Clínica (SADEBAC), Sociedad de Ginecología y Obstetricia de Buenos Aires (SOGIBA). "Consenso Argentino Intersociedades para el Manejo de la Infección del Tracto Urinario". Parte I. *Rev Panam Infectol* 9(3): 57-69. 2007.

Vergara Marta y colaboradores: *Las Infecciones Bacterianas y el Laboratorio de Bacteriología.* Posadas, EdUNaM, 2009.

CAPÍTULO 3
Infecciones del Tracto Genital (ITG)

Las bacterias y la virulencia* ■ **marta vergara**

La población microbiana normal vaginal

La población microbiana llamada población indígena esta representada por una colección de microorganismos que se encuentran habitualmente en la mujer sana y que coexisten en forma equilibrada, sin ocasionarle daño.

Esta población llamada normal está constituída por bacterias principalmente.

Como vimos en el **Capítulo 1** la población llamada normal se adquiere con rapidez durante y poco tiempo después del nacimiento y se modifica durante el crecimiento.

Una de las zonas del organismo más colonizada por microorganismos es el tracto genital femenino. A pesar de ello el medio ambiente de la vagina se protege de diferentes maneras.

La barrera física de sus tejidos, la presencia de la población microbiana residente o endógena, la respuesta inmune humoral y mediada por células y la producción de secreciones que contienen lisoenzimas, ácidos, lípidos, inmunoglobulinas como la IgA contribuyen a la protección de esta población microbiana.

---

* Los aspectos microbiológicos, la virulencia y el tratamiento de infecciones producidas por *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *U. urealyticum*, *M. hominis* y *Treponema pallidum,* son tratados en el **Capítulo 8**: Infecciones Bacterianas Perinatológicas.

Debido a la influencia de los estrógenos el epitelio produce glucógeno que se degrada por la acción de *Lactobacillus* spp., a glucosa y finalmente a ácido láctico, que mantiene un pH vaginal inferior a 4,5 que previene el crecimiento de bacterias patógenas siendo un medio de excelencia para el crecimiento de los lactobacilos.

El fluido vaginal normal contiene entre 5 y 10 diferentes tipos de microorganismos que incluyen tanto a los *Lactobacillus* spp., facultativos y anaerobios en concentraciones entre 10^5 y 10^7 células/ml, que se unen a los receptores de las células epiteliales de la vagina y de esta manera evitan la presencia y entrada de organismos no deseados.

Otros microorganismos se encuentran en baja concentración como varios cocos grampositivos de los géneros *Staphylococcus y Streptococcus*, algunas enterobacterias*, Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis* y otras bacterias anaerobias.

La llamada "secreción normal" de la vagina de la mujer adulta,es clara, blanca, floculada, altamente viscosa, sin olor, con pH < 4,5 y microscópicamente libre de micelios, libre de *Trichomonas vaginalis*, esporas y células guías.

Como llega la mujer adulta a esta llamada "secreción normal":

Durante el nacimiento por vía vaginal, las niñas se colonizan rápidamente con la población microbiana de la madre, siendo la misma, semejante a la que se encuentra en la edad reproductiva.

Después del nacimiento, son *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., enterobacterias, anaerobios, entre otras bacterias, las constituyentes de esta población microbiana en forma transitoria. La que se modifica a medida que la niña crece.

En la edad de la infancia, al descender los niveles de estrógenos, el pH se eleva a 6-7 que es el habitual en la infancia, y la población microbiana se transforma en población bacteriana mixta.

La desaparición de *Lactobacillus* spp*.,* está dada por la elevación del pH y por la disminución de los niveles estrogénicos.

A esta edad, entre los microorganismos anaerobios, *Veillonella* spp., diplococos gramnegativos de morfología semejante a *Neisseria gonorrhoeae,* están presente y ello nos obliga a ser cuidadosos, por lo que no se debe realizar el estudio en niñas unicamente mediante observación microscópica directa de la muestra, pues lleva a la confusión con *Neisseria gonorrhoeae*, pudiendo dar lugar a un diagnóstico incorrecto con consecuencias médico legales. Por ello los estudios en mujeres y en especial en niñas, de-

ben realizarse por métodos que posibiliten la correcta identificación de los microorganismos involucrados.

Los cambios hormonales que se inician hacia la perimenarca conducen a la aparición de *Lactobacillus* spp., con importante descamación celular y muchas veces asociados a una abundante secreción que lleva a la consulta médica. Estas situaciones nos obligan a tenerlas presentes a fin de evitar diagnósticos erróneos y tratamientos antimicrobianos innecesarios.

También los estrógenos que se elevan, posibilitan la aparición de *Candida* spp.

Durante la edad reproductiva y hasta la menopausia, por la producción de glucógeno por los estrógenos circulantes, predominan los *Lactobacillus* (bacilos *Döderlein*). Estos microorganismos son capaces de metabolizar el glucógeno a ácido láctico, lo que inhibe la colonización de otros microorganismos, fundamentalmente por mantener un pH bajo.

Bacterias como corinebacterias por semejanzas morfológicas y tintoriales en frotis coloreados, pueden ser confundidas con los lactobacilos.

Muchos de los microorganismos constituyentes de la población microbiana endógena, indígena o habitual, no producen patología por sí mismos, pero, en determinadas circustancias, pueden volverse patógenos o desencadenar infecciones. Es importante destacar que más del 50% de las consultas ginecológicas se deben a ITG producidas por la población microbiana endógena, indígena o habitual.

Los microorganismos que la componen (especies aerobias y anaerobias) actúan por diversos mecanismos, tanto en la protección del huésped como en la posibilidad de desarrollar infecciones. Por ello el mantenimiento de la ecologia microbiana de la vagina depende de factores inherentes al huésped, al medio ambiente y al microorganismo.

Todos los factores que el microorganismo infectante pone en juego para desarrollar la patogénesis están relacionados con adherencia, invasión, producción de sustancias como bacteriocinas, producción de ciertas enzimas como por ej IgA proteasa, fosfolipasas, sialidasas, ureasas, colagenasas y material extracelular, que posibilitan a las bacterias unirse selectivamente a receptores (importantes factores inherentes al huésped, generalmente glicoproteínas) de las células epiteliales de la mucosa del huésped, como vimos en **(Capítulo 1)**.

La denominada población microbiana permanente o residente, está compuesta por los microorganismos que se recuperan durante todo el ciclo menstrual, en la mayoría de las mujeres: *Lactobacillus* spp., *Corynebacterium* spp.

Cuando nos referimos a dicha población como transitoria o esporádica, nos referimos a aquellos microorganismos endógenos que se establecen solo en un momento del ciclo, como los micoplasmas genitales.

Gardnerella vaginalis, Streptococcus grupo B (SGB), son considerados población bacteriana intermitente, o sea que aparecen cíclicamente.

Los patógenos exógenos son, entre las bacterias, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum.*

Los endógenos, como *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, anaerobios, *Mycoplasma* spp., que pueden, ante alguna ruptura del equilibrio microbiano, desencadenar infecciones, solos o asociados, son llamados también patógenos potenciales.

Entre la ITG encontramos las Infecciones de Trasmisión Sexual (ITS) que tienen un comportamiento epidémico en la mayor parte de los países. Los adolescentes y jóvenes son la población más vulnerable para padecerlas y transmitirlas. Se calcula que un cuarto de los jóvenes sexualmente activos en el mundo están afectados por alguna ITS.

El sexo más afectado es el femenino y la edad más afectada es entre 15-24 años. Existen diferentes factores que facilitan la difusión de dichas enfermedades, dentro de ellas podemos señalar la falta de educación sexual y el inicio precoz de la actividad sexual, como los factores más responsables de estas cifras.

Estas infecciones se consideran a nivel mundial causa importante de morbilidad, complicaciones y secuelas como son la enfermedad inflamatoria pélvica, el embarazo ectópico, la estrechez uretral en el hombre, la infertilidad en ambos sexos, y el cáncer cervical y de pene.

El embarazo obliga a investigar otros microorganismos, que pueden estar asociados a infecciones, algunas severas y de pronósticos a tener en cuenta.

Algunos microorganismos, inclusive los de la llamada población microbiana indígena, transitoria o permanente, producen enzimas, como las fosfolipasas, que pueden actuar sobre las membranas corioamnióticas, con el riesgo de llevar al parto pretérmino (PPT) o rotura prematura de membrana (RPM), como veremos más adelante.

El mayor riesgo de una infección del tracto genital superior puede estar en el posparto, por la presencia de sangre y loquios que facilitan la instalación de anaerobios y enterobacterias.

Neisseria gonorrhoeae

Fue Hipócrates en el año 460 (AC) quien hace las primeras descripciones científicas de la infección gonocócica, producida por esta bacteria y la llama "stranguria". Hacia el año 130 (AC), fue Galeno quien definiendo como"salida de flujo de semilla " al considerar equivocadamente a la secreción purulenta, una espermatorrea, la llamó gonorrea.

Durante muchos años, se consideró que la gonorrea y la sífilis eran una única enfermedad, y que la sífilis era una etapa tardía de la gonorrea.

Fue necesario llegar a 1831 para que Ricord estableciera que se trata de dos enfermedades

El género *Neisseria* es uno de los cuatro géneros incluidos en la familia *Neisseriaceae.*

Las dos especies del género, *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis* son las de mayor importancia clínica.

Si bien ambos microrganimos tienen una relación muy estrecha desde el punto de vista genético, las manifestaciones clínicas de las enfermedades que causan, como las rutas que siguen para causar el daño, son diferentes.

Neisseria gonorrhoeae fue descubierta en 1885 por Neisser de quien toma su nombre el género. Es una bacteria en forma de diplococo gramnegativo, no flagelado, no capsulado.

Largos pelos de proteínas llamadas fimbrias cubren la superficie externa. Estas fimbrias son subunidades de péptidos llamados pilis.

La célula tiene un diámetro de entre 0,6 a 0,8 micrones. Bajo tinción de Gram, se observa al microscopio como dos estructuras arriñonadas o en granos de café, unidas por la concavidad en pares adyacentes, casi siempre agrupadas en el espacio extracelular o en el citoplasma de polimorfonucleares abundantes .

Neisseria gonorrhoeae o gonococo es sumamente lábil a temperaturas extremas, frío o calor, a la desecación y a varios antisépticos. Teniendo en cuenta estas características, se trata de una bacteria que para obtener su crecimiento y mutiplicación, debe ser cultivada en los medios de cultivo adecuados, de inmediato.

Es un patógeno obligado que se lo encuentra generalmente dentro de los polimorfonucleares, provocando la más frecuente de las enfermedades venéreas clásicas.

Es muy semejante a otras neisserias, en su morfología y la envoltura celular es también similar a la de otras bacterias gramnegativas.

Las numerosas y largas fimbrias que posee, son de importancia en la adherencia.

Existen medios de transporte que pueden mantener la viabilidad de los gonococos aun por 6 horas, antes de su inoculación en los medios apropiados.

No tienen vida libre en el medio ambiente.

Para el crecimiento en medios artificiales requieren sangre, NAD, extracto de levadura, y una temperatura de incubación entre 35-37 ºC .

Muchas cepas recién aisladas tienen un requerimiento relativo o absoluto de CO_2 atmosférico en concentraciones de alrededor del 5%.

Todas las cepas de *Neisserias* son aerobias estrictas en las condiciones de crecimiento habituales de laboratorio, pero el microorganismo crece en condiciones anaerobias cuando se aporta nitrito como aceptor de electrones.

Las colonias se hacen visibles a las 24–48 hrs de crecimiento habituales pero en la mayoria de los medios la viabilidad solo permanece hasta las 48 hrs, dado que los microorganismos se autolisan.

Los requerimientos para un desarrollo son complejos, ya que requieren vitaminas, aminoácidos, hierro, entre otros productos, desarrollo que se mejora si hay humedad en el ambiente de incubación.

Los gonococos carecen de flagelos y son inmóviles.

En las infecciones genitales contribuyen al transporte de los gonococos las contracciones uretrales o uterinas o mediante la adherencia al semen, a las celulas de las criptas anales y también faringeas.

Llegados a la mucosa uretral o vaginal, alcanzan el epitelio columnar de uretra o el cuello uterino y se adhieren, para luego multiplicarse e iniciar el daño.

Los gonococos no producen exotoxinas. Poseen varias estructuras celulares comprometidas en las diversas etapas del camino al daño.

Si bien es compleja la composición antigénica de gonococo, es de interes identificar por lo menos tres clases principales de antígenos: el antígeno del pilus- el lipooligosacárido (LOS) y componentes proteicos de la membrana externa.

Pilis: La expresión de los pilis está en función del complejo gen *pil*.

Los pili son apéndices de superficie no flagelares de unidades repetidas de la proteina llamada pilina.

De muestras clínicas se recuperan cepas con distintos tipos de colonias llamadas P^{+} y P^{++} (antes denominadas T1 y T2), las que portan numerosos pilis que se extienden por toda la superficie celular.

Transcurrido un período de 20 a 24 hrs durante el desarrollo las células sufren una modificación y pierden sus pilis, las reconocemos como cepas P^-, llamadas antes T3 y T4.

Este fenómeno llamado de reorganización cromosómica con variaciones de fase, es decir un cambio reversible entre estados alternativos conduce a un cambio espontáneo entre tipos de colonias P^+ o P^{++} a P^-, fenómeno conocido como **variación de fase**, que lo usan los gonococos para evadir las respuestas del huésped **(Capítulo 1).**

Esta alteración de los pilis de los gonococos conduce a que una cepa de gonococo puede tener pilis de diferente composición antigénica, lo que da una marcada variación antigénica en la superficie celular de las distintas cepas.

Las células sin pilis, no son virulentas. Las cepas piliadas si lo son, fundamentalmente porque se unen más fácilmente que las cepas P^- a las células mucosas humanas, de allí que son más virulentas.

Los pili posibilitan a la bacteria resistir a la destrucción por polimorfonucleares y también la adhesión a células epiteliales no ciliadas, lo que lleva a la endocitosis con la consecuente pérdida de cilias de las células adyacentes.

Los gonococos se transportan dentro de la vacuola endocítica donde, además de migrar, se multiplican, liberándose luego en el espacio subepitelial.

El camino al daño se inicia en la adherencia- fagocitosis y transporte en vacuolas a la base de la célula y de allí a tejidos subepiteliales.

La membrana externa: La envoltura celular está compuesta por tres capas distintas: una membrana citoplasmática interna, una pared celular intermedia de peptidoglucano y una membrana externa que contiene el lipooligosacárido (LOS) y varias proteínas, como toda bacteria gramnegativa.

- El LOS, con diferencias en su estructura química con el lipopolisacárido(LPS) de toda bacteria gramnegativa, con quien se corresponde, tiene su lípido A, que es endotóxico y responsable de la severidad de la infección.
- El LOS es el antigeno de superficie que interviene primero en la reacción bactericida del suero. Es elemento clave en la patogenicidad de *N. gonorrhoeae.* Estimula la producción del factor de necrosis que provoca daño celular, siendo utilizado además, en la serotipificación de las cepas,

Los neutrófilos son atraídos y fagocitan la bacteria. La bacteria produce diferentes tipos de LOS y puede modificar su estructura por medios aun desconocidos. El LOS produce daño en la mucosa y en las trompas de Falopio a través de enzimas (proteasas).

Una serie de proteinas se encuentran en la envoltura celular donde la proteina I (Por) representa el 60% del peso total de la membrana externa.

- la denominada **proteína I** (Por), es una porina que forma canales que posibilitan a los solutos acuosos atravesar la membrana externa. La proteína porina: P.I (Por), es la invasina que media en la penetración de la célula del huèsped. Cada gonococo expresa un solo tipo de Por y como existen diferentes tipos antigénicos se usan para tipificar el microorganismo. Permite la serotipificación por ser inmunogénica y contribuye a la invasión por su resistencia a la acción bactericida del suero por lo que se la asocia a la patogenia. Es responsable de la bacteriemia, cuando ocurre.
- la denominada **proteína II** (Opa), que es codificada por el gen *opa*, da a las colonias el aspecto de opacas, siendo transparentes las que carecen de esta proteína.

Existen variantes de Opa. Una cepa de gonococo puede expresar hasta 11 variantes de Opa. La proteína P II u Opa es una proteína transmembranal y participa en la fijación a las células del huésped.

La expresión de PII es fenotípicamente variable, lo que se traduce en que el gonococo puede expresar genéticamente seis o más P II las que son funcionalmente diferentes.

La bacteria debe ingresar a las mucosas y a través de las células epiteliales alcanzar el tejido submucoso.

Diversas variantes de Opa aumentan la adherencia entre los propios gonococos y a diversas células eucarióticas, entre ellas los fagocitos, inhibiendo la fagocitosis. También muchas de ellas favorecen la invasión de las células epiteliales. Se las relaciona también con la resistencia al suero humano no inmune, se recuperan mayormente en mucosas y dan a las colonias el aspecto opaco mencionado.

Se ha observado que la mayoría de las cepas cervicales durante la menstruación y las localizadas en sitios esteriles como trompas de Falopio, sangre y líquido sinovial, carecen de Opa y desarrollan en colonias translúcidas. El gonococo expresa cambios rápidos y reversibles de la PII.

- la denominada **proteína** III (Rpm) forma porinas con la PI- es el sitio de unión de anticuerpos IgG bloqueantes que interfieren que interfiere

en la destrucción mediada por el complemento del inmunosuero contra *N. gonorrhoeae*. Esta proteína es otro factor de virulencia, no tiene variantes y forma complejo con el lipooligosacárido (LOS).
- Es así como los neutrófilos son atraídos y fagocitan al gonococo
- La IgA proteasa que inactiva el principal tipo de anticuerpos producidos en las mucosas.
- *N. gonorrhoeae* infecta en especial el epitelio cilíndrico o cúbico.
- Los pili y Opa colaboran en la unión al epitelio de la mucosa.

Luego se produce la penetración de los gonococos a las células epiteliales y la llegada de ellos a los tejidos de la submucosa.

Este hecho gatilla la respuesta de neutrófilos y la aparición de pus la que se diagnostica en los frotis teñidos donde se observan los gonococos en el interior de los neutrófilos.

Algunos gonococos pueden evadir la fagocitosis y no son destruidos y continúan multiplicándose intracelularmente.

El camino al Daño

El gonococo expresa su primer nivel de patogenicidad al adherirse a la superficie del epitelio uretral, endocervical, vaginal e incluso a los espermatozoides humanos y a las células epiteliales no ciliadas de las trompas de Falopio.Son las fimbrias, unidades repetitivas de pilina y la proteína de opacidad de colonias , Opa o P.II que posibilitan la unión a la superficie del epitelio columnar.

Así, las zonas más frecuentemente comprometidas son uretra, cérvix, recto, faringe y conjuntiva. El epitelio escamoso, como la vagina adulta, no es susceptible a la infección por *N. gonorrhoeae*.

La bacteria piliada se adhiere con mayor eficiencia que la no piliada y de hecho, sólo las primeras son infecciosas.

Se conocen tres mecanismos por los cuales la *N. gonorrhoeae* evita la fagocitosis:
- Los los pili bacterianos además de intervenir en la adherencia, también protegen a la bacteria de la fagocitosis
- A pesar que muchas proteínas P II promueven la adherencia, otras protegen a la bacteria pues ella puede generar antígenos de superficie que imitan a los antígenos naturales del huésped evadiendo el reconocimiento por el mismo.

- *Neisseria gonorrhoeae* al expresar variacion antigénica, al revertir la expresión de sus fimbrias, Opa, LOS, con alta frecuencia, desarrolla muchos intrincados mecanismos de patogenicidad y se convierte en una bacteria de gran poder de virulencia y hábil en eludir las respuestas del huésped con lo que dificulta el desarrollo de estrategias vacunales.

Por lo que las consecuencias son:

- Adherencia a las células epiteliales no ciliadas.
- Enlentecimiento de las células ciliadas (la actividad ciliar es fundamental para el transporte del óvulo desde el ovario hacia el útero)
- Muerte de las células ciliadas que son eliminadas de la superficie epitelial, aún que no haya microorganismos intactos, pues se puede realizar aún por el LOS o fragmentos de pared celular.
- Endocitosis de los gonococos
- Transporte de los gonococos hacia el interior de las células
- Multiplicación de los gonococos dentro de las vacuolas, donde se hayan protegidos de: anticuerpos, fagocitos y antimicrobianos.
- Las vacuolas llenas de gonococos alcanzan la base de las células no ciliadas y se fusionan con la membrana basal.
- Descarga de gonococos en el tejido conectivo subepitelial, desde donde pueden ingresar a los vasos sanguíneos para diseminarse, causando una importante respuesta inflamatoria, además de la invasión celular.

La infección gonocócica diseminada (IGD) es la consecuencia de dicha diseminación y se manifiesta como artritis séptica, síndrome de poliartritis y dermatitis. En adultos jóvenes, la IGD es una de las causas de la artritis infecciosa. En los hombres, un pequeño porcentaje de ellos, puede tener complicaciones como epididimitis o prostatitis e incluso septicemia, peritonitis y meningitis.

En los niños, la enfermedad siempre se sospecha como consecuencia de abuso sexual (en las niñas el pH alcalino de su vagina favorece el desarrollo de este microorganismo) y en recién nacidos como contaminación en el canal del parto, con la conjuntivitis, como la expresión más frecuente.

En la mujer (donde hasta un 80% de las infecciones son asintomáticas) el sitio de elección genital es el endocérvix. En las sintomáticas la infección se manifiesta como cervicitis, disuria, secreción vaginal aumentada, fiebre y dolor abdominal.

Recto y faringe pueden ser sitios de elección también.

En la mujer la enfermedad inflamatoria pélvica (EPI), es la principal complicación de la infección gonocócica. Esta se produce por daño en las trompas de Falopio, daño de mucosa y pérdida de actividad ciliar y exfoliación de las células epiteliales ciliadas como en la gonococia activa, lo que conduce a la esterilidad, al ser afectado, por las cicatrices del daño que deja gonococo, el pasaje de los óvulos y del líquido a través de las trompas.

La toxicidad se debe a la porción lipídica A.

Los pacientes desarrollan títulos de Ac IgG IgM contra el LOS y dan protección contra la bacteriemia gonocócica causada por cepas sensibles al suero.

Varias de sus estructuras, además de su importancia en los mecanismos de la patogenia de la infección gonocócica, tienen también importancia en la respuesta inmunológica por lo que son usadas en estrategias vacunales dirigidas a lograr la profilaxis antigonocócica.

Vaginosis bacteriana (VB)

La vaginosis bacteriana (VB) es una infección sinérgica.

Es la infección más frecuente que causa vaginosis en la mujer que se encuentra en edad reproductiva. La infección es de causa polibacteriana, con la proliferación de un número variable de microorganismos.

Esta producida por una alteración del equilibrio microbiano vaginal con una disminución manifiesta de la proporción relativa de lactobacilos que conduce al sobredesarrollo de *Gardnerella vaginalis* y microorganismos anaerobios como *Mobiluncus* spp. *Bacteroides* spp. *Prevotella* spp. y también en muchos casos *Mycoplasmas hominis, Ureplasma urealyticum.* (Complejo GAM-M).

Alteraciones originadas por el sobrecrecimiento de la microbiota anaeróbica(marcada ausencia de *Lactobacillus*) con alteración del pH, -olor fétido-(por las decarboxilasas y aminopeptidasas elaboradas por las bacterias anaerobias y los micoplasmas, que transforman los aminoácidos producidos por la degradación proteica de la lisina, ornitina y arginina en trimetilamina, putrescina y cadaverina) se detectan por el test de aminas y la elevación del pH.

Estas aminas, productos de la fermentación, no se relacionan con daño tóxico, no generan respuesta inflamatoria.

Cualquier factor que redujera el potencial redox del sistema, favorecería también el sobrecrecimiento de los anaerobios.

Este desequilibrio facilita la multiplicación de la microbiota restante.

Por estos mecanismos de adquisición la VB está considerada una infección endógena y no una ITS.

La VB es la causa más frecuente de vaginitis infecciosa.

La frecuencia de su aparición es difícil dado la escasa sintomatología que lleva a la consulta. Es asintomatica hasta en un 70% de los pacientes. Esta prevalencia varía según la población estudiada.

Es muy frecuente en las gestantes. Entre el 10-30%, de ellas presenta VB, y en pacientes con una ITS, resulta mayor esa cifra.

A pesar de una elevada frecuencia de VB en mujeres con ITS y con múltiples parejas, no hay evidencias que admitan ser considerada una ITS.

Junto a los mycoplasmas, como veremos, la VB constituye un factor de riesgo para la RPM y el PPT.

Otras situaciones de consideración como la EPI, y la endometritis pueden estar asociadas a una VB, en especial en pacientes sometidas a procesos ginecológicos invasivos o intervenciones quirúrgicas (Tohill et al, 2004).

La VB es la infección cervicovaginal más frecuente (representando un 30% de ellas) también en las mujeres en edad fértil, no gestantes.

Si bien no es una ITS, algunos expertos la consideran una de las principales causas de leucorrea y un fuerte predictor de infecciones por gonococos y clamidias.

Se asocia la VB a la EPI, al encontrarse esta microbiota en endometrio y trompas de mujeres con esta patología, generalmente luego de instrumentación ginecológica invasiva como la histerectomía, biopsia endometrial, colocación de dispositivos intrauterinos, cesáreas y legrados.

En el embarazo la vaginosis bacteriana está asociada también a severas enfermedades perinatológicas como endometritis, corioamnionitis, RPM, amenaza de PPT, y bajo peso al nacer (BPN), endometritis puerperal y EPI.

La RPM y el PPT están asociados a la presencia de fosfolipasas, endotoxinas y colagenasas que degradan el colágeno de las membranas fetales.

Es de importancia tener presente que la corioamnionitis producida por estos microorganismos y *Streptococcus agalactiae* grupo B, (SGB), se asocia a enfermedades severas debido al daño del tejido cerebral, como parálisis cerebral por lesión de la sustancia blanca con retardo mental y crecimiento fetal retardado.

A este daño se agrega la liberación de mediadores de la respuesta inflamatoria, citoquinas, en especial la IL6 y la IL8 que aumentan en plasma fetal incrementando la respuesta inflamatoria, que por sí misma produce también importante daño al SNC.

En la patogénesis de estas infecciones intervienen, entre otros factores, la interrupción de las interacciones ecológicas normales de otros miembros del contenido microbiano habitual, por el desequilibrio producido por enzimas como las fosfolipasas, sialidasas, producidas por parte de anaerobios.

Estas enzimas facilitan la adherencia, invasión y diseminación de estos microorganismos con la destrucción de mucosas.

Las bacterias además, dañan también por sí mismas a diversos tejidos mediante la producción de partículas tóxicas. Hay invasividad, toxicidad, hipersensibilidad.

La lisogenización de lactobacilos por fagos lisogénicos que llevan a la destrucción de estas bacterias, representantes de la microbiota residente vaginal, se postula como un eficaz disparador de este proceso

Si bien no se conocen con certeza los factores desencadenantes de este desequilibrio microbiano, la ducha vaginal pareciera ser uno de los relacionados a él, comportándose como un importante factor de riesgo, además de el inicio temprano de las relaciones sexuales. Una marcada actividad sexual en la edad fértil parece aumentar la frecuencia de la aparición de la VB aunque también se presenta en mujeres vírgenes, sin nigún tipo de actividad sexual documentada.

En general se acepta que la VB no es una enfermedad de transmisión sexual y no se establece en la uretra masculina.

Luego del coito, la secreción alcalina del semen acentúa el olor a pescado de la secreción vaginal, liberado por las aminas presentes

Nos encontramos ante un cuadro de VB: exudado vaginal blanco grisáceo, homogéneo, adherente y uniforme, ausencia de respuesta inflamatoria, células claves (células epiteliales tachonadas de bacilos, muchos curvos, delgados, pleomórficos) ausencia de lactobacilos, pH elevado y test de aminas positivo.

Chlamydia trachomatis

Pertenece al Orden *Chlamydiales*- Familia *Chlamydiaceae*- Género *Chlamydia*- Especies

Chlamydia trachomatis, Chlamydia psittaci, Chlamydia pneumoniae, Chlamydia pecorum.

Con respecto a las especies de importancia clínica en medicina humana, la modificación mas importante alcanza a las especies *Chlamydia psittaci* y *Chlamydia pneumoniae,* las que se propone incorporarlas a un nuevo género, *Chlamydophila* y sus especies *Chlamydophila psittaci* y *Chlamydophila pneumoniae*. La diferencia en el origen de estas cepas, entre otras, justifica esta propuesta.

Chlamydia es un parásito intracelular obligado con limitada capacidad anabólica categorizado como bacteria por la composición de su pared y por su división.

Recién en 1957 pudo ser aislada en huevos embrionados y en 1963 en cultivo celular y reconocida como un agente etiológico de enfermedades de transmisión sexual.

Chlamydia trachomatis es una bacteria asociada a un gran número de infecciones humanas, principalmente infecciones oculares y genitales.

Sus complicaciones más severas incluyen la ceguera y la infertilidad.

Sin lugar a dudas, *Chlamydia trachomatis* es causa importante de cervicitis y la causa más frecuente de uretritis no gonococcica y post gonocócica, cuya trasmisión es por contacto sexual. Pueden ser causa de EPI y de embarazo ectópico.

Las manifestaciones más frecuentes, de las asociadas a las enfermedades ginecológicas y obstétricas, son: uretritis, cervicitis, endometritis, bartolinitis, EPI, enfermedades perinatológicas (conjuntivitis- nasofaringitis- neumonía- vaginitis), infecciones durante el embarazo (aborto espontáneo- PPT).

En neonatos, el pasaje de clamidia por el canal del parto de una madre infectada, puede producir en el recién nacido un cuadro de ophtalmia neonatorum o conjuntivitis del recién nacido. Otras localizaciones en el recién nacido pueden ser a nivel de nasofaringe, aparato genital y tracto gastrointestinal.

En la mujer los síntomas más reveladores son una descarga vaginal mucopurulenta (con importante respuesta inflamatoria), sangrado post coito y urocultivos sin desarrollo microbiano y con sedimento patológico.

La edad joven (en ambos sexos, menores de 25 años), parejas sexuales múltiples y en la mujer, especialmente el tener relaciones con un hombre con uretritis gonocócica o con una UNG, son los principales factores de riesgo. La vulnerabilidad de las mujeres aumenta con el uso de los anticonceptivos orales y por la presencia de ecto-

pia cervical, ya que expone el epitelio columnar al inóculo infeccioso.

En el hombre la sospecha se basa en descarga uretral y respuesta inflamatoria positiva. Las vías espermáticas infectadas, están más asociadas a varones jóvenes.

La artritis y el síndrome de Reiter son frecuentes complicaciones de infecciones no tratadas.

Enfermedades como el tracoma, la conjuntivitis de inclusión, el linfogranuloma venéreo (LGV), son otras importantes enfermedades causadas por diferentes serovares o serotipos de *Chlamydia trachomatis*.

El LGV es una patología subaguda o crónica con aparición frecuente en personas que viven en áreas subtropicales y en condiciones socioeconómicas muy pobres.

Los serotipos de clamidias involucrados son L1, L2 y L3.

Dado que la presentación es de un chancro genital o rectal con importante adenopatía (bubón) el diagnóstico mediante la punción ganglionar antes de la fistulización, a fin de evitar la sobreinfección, es fundamental para establecer el tratamiento.

Chlamydia trachomatis, es un parásito intracelular obligado que infecta exclusivamente al hombre.

Tiene limitada capacidad anabólica.

Si bien es una bacteria por:

- la composición de su pared celular.
- su reproducción por fisión binaria.
- el poder ser inhibido por antibióticos.

Chlamydia trachomatis es un parásito intracelular obligado por dependencia de la célula huésped que le provee la energía necesaria, ante su imposibilidad de fabricar su propio ATP.

Esta característica le impide multiplicarse en medios de cultivo libres de células.

El camino al Daño

Chlamydia trachomatis es una de las bacterias de transmisión sexual más frecuente en el mundo.

Las infecciones producidas por *Chlamydia trachomatis* son consideradas como la causa más común de ITS de etiología bacteriana en muchos países industrializados.

La inflamación, cicatrización, activación de prostaglandinas y leucotrienos sumado a los mecanismos humorales y celulares que se ponen en movimiento al producirse el ascenso de la bacteria en el tracto genital superior dan sustento a lo ya estipulado acerca de un comportamiento asintomático por meses o años, así como la de los mecanismos humorales y celulares que en conjunto contribuyen a la inflamación mantenida y a la destrucción tisular, lo cual se manifiesta clínicamente como un proceso inflamatorio pelviano crónico.

En el curso de la infección humana, las clamidias se proporcionan su propia captación por las células (endocitosis dirigida por el parásito y mediada por receptores) e ingresan a las células epiteliales por un mecanismo bastante acelerado, en la forma de elementos llamados cuerpos elementales (CE).

También otras formas de ingreso están sugeridas, como la fagocitosis o la pinocitosis.

Las clamidias son un grupo especial de bacterias pequeñas, que afectan las células epiteliales y macrófagos, multiplicándose en su interior. Es un microorganismo intracelular con un único ciclo de vida bifásico replicativo intracelular, lo cual las convierte en parásitos obligados, ya que carecen de algunos mecanismos para la producción de energía metabólica, al no sintetizar ATP, y poder localizarse intracelularmente escapando al sistema inmune de defensa del huésped. Este crecimiento intracelular permite a *Chlamydia trachomatis* producir una infección crónica, al evitar la apoptosis de la célula a la que infecta, comentado ya.

Este ciclo se inicia infectando la célula huésped mediante los CE, pequeñas esferas de 0,2 a 0,4 μm de diámetro, que representan la forma infecciosa, transmisible y extracelular de clamidia.

Los CE son fagocitados por la célula a través de los fagosomas (vacuolas unidas a la membrana) en forma semejante a como lo hacen la mayoría de los parásitos intracelulares, involucrando a diversas proteínas en este mecanismo. Los CE tienen reservas de adenosintrifosfato (ATP) y de adenosintrifosfatasa (ATPasa) que se activa por agentes reductores del medio.

Mediante la activación de estas sustancias y la reducción de puentes de disulfuro de proteínas de membrana, se reorganizan los CE y dentro de las células se transforman en cuerpos reticulados (CR).

Los CR son intracelulares y metabólicamente activos. Son de mayor tamaño que el CE

Utilizando la energía que le provee la célula huésped, se replican por división binaria, dando las típicas inclusiones citoplasmáticas de clamidia. Los CR representan las formas replicativas e intracelulares de clamidias. Su tamaño es de 800 a 1200 μm de diámetro.

A medida que se multiplican los CR, las clamidias sintetizan su propio ADN, ARN y proteínas. Se llena el endosoma de inclusiones citoplasmáticas y elaboran un polímero de glucógeno que se acumula en la vesícula.

La detección de este glucógeno por la técnica del lugol es de diagnóstico presuntivo en algunas localizaciones de clamidias.

Se ha demostrado un complejo y minucioso mecanismo de interacciones entre las clamidias y las células del huésped durante todo su ciclo vital.

Una serie de proteínas sintetizadas por el microorganismo serían transportadas hacia fuera de la membrana de inclusión, en un sistema de secreción tipo III como vimos en otras bacterias gramnegativas **(Capítulo 1).**

Por estos mecanismos podrían regularse el transporte vesicular y hasta la inhibición de la fusión de las inclusiones clamidiales con los lisosomas de la célula huésped. Se cree que estos mecanismos son los que determinan la transformación del CR en CE.

La ruptura en el interior de la célula de las inclusiones conteniendo CE, conduce a la lisis y muerte celular al liberarse los CE. En algunas serovariedades, los CE se liberan no necesariamente con lisis celular.

El ciclo se reinicia cuando la célula huésped se lisa, previa transformación del CR en CE que es el que va a infectar nuevas células.

Ante la multiplicación de clamidias en su etapa de infección productiva, el huésped reacciona produciendo sustancias clamidostáticas como interferones, factor de necrosis tumoral y citoquinas que estimulan la respuesta neutrofílica inicial.

O'Connell y otros autores refieren que la *Chlamydia trachomatis* no produce daños directos a los tejidos, pero que sí induce una severa respuesta inflamatoria en el sitio infectado, mediado por la interleukina-1 como iniciador de la destrucción tubaria, afectando fundamentalmente las células ciliadas. Todas las cepas estudiadas de la familia *Chlamydiaceae* presentan el mis-

mo (LPS) que parece no diferir del LPS de las otras especies del orden *Chlamydiales*.

También el LPS, a pesar de tener una porción lipídica de menor toxicidad que otras endotoxinas bacterianas, es inmunogénico y los anticuerpos contra el mismo pueden ser detectados por técnicas inmunológicas como la fijación de complemento, ELISA, e inmunofluorescencia. Parece ser el antígeno clamidial que puede inducir la producción de citoquinas proinflamatorias.

La proteína principal de la membrana externa, MOMP, cumple el rol de una porina en los CR y es fundamental en el mantenimiento de la rigidez del CE.

La MOMP tiene zonas hipervariables y zonas conservadas. Cuatro regiones variables expuestas en la superficie celular, donde se encuentran epitopos específicos de género, especie y tipo, posibilitan su identificación mediante anticuerpos monoclonales.

En respuesta a la presión del sistema inmune *Chlamydia trachomatis* puede expresar diversas proteínas.

Las proteínas de choque térmico (GroEl de 60kDa y DnaK de 70kDa), estarían involucradas en el desarrollo de una respuesta de tipo autoinmune.

La lesión a las células huéspedes se genera fundamentalmente por una inflamación aguda y crónica, con destrucción de tejidos.

Cuando la infección es crónica, macrófagos y linfocitos infiltran los tejidos.

Independientemente de la localización de la clamidia, la respuesta inicial a la infección parece estar mediada por leucocitos polimorfonucleares en primer lugar.

Como ocurre en las infecciones gonocócicas, en las causadas por clamidias, es la propia respuesta del huésped a la infección, la que produce el daño tisular.

Se especula que la infección gonocócica o reactiva una infección clamidial o bien incrementa la susceptibilidad del huésped a la infección clamidial, ya que se ha demostrado que las personas infectadas por *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* eliminan mayor cantidad de *C. trachomatis* que aquellos infectados solo con *C. trachomatis.*

Haemophilus ducreyi

Esta bacteria es el agente causal del chancroide o **chancro blando** una enfermedad aguda de corta evolución que se presenta frecuentemente en mujeres promiscuas y que es trasmitida por contacto sexual. Se presenta como una úlcera de bordes irregulares sobre los genitales, con marcada inflamación y dolor.

El chancro blando es la principal responsable de enfermedad ulcerosa genital en América Latina.

Haemophilus ducreyi es un bacilo gramnegativo que se presenta formando cordones junto a otros microorganismos piógenos.

Se han identificado algunos probables factores de virulencia, como las fimbrias superficiales, lipopolisacáridos y una citotoxina-hemolisina en estudio su patogenicidad.

Los ganglios linfáticos regionales están hipertrofiados y dolorosos.

Este microorganismo debe ser siempre investigado ante la solicitud de un estudio de sífilis, dada las características de su presentación como chancro en zonas de prepucio, frenillo, horquilla vulvar y labios mayores.

Se lo considera un cofactor para la transmisión del VIH.

El examen microscópico, previa coloración de Gram, del material tomado de la úlcera, muestra cocobacilos gramnegativos de características morfológicas y de disposición de los haemophilus, aunque frecuentemente la presencia de otra población bacteriana dificulta un diagnóstico presuntivo al interferir en la visualización del microorganismo.

Diferencias en el requerimiento de los factores X, V, dependencia de un ambiente de CO_2 para su desarrollo, producción de hemólisis y de catalasa, son las principales técnicas de laboratorio utilizadas para su diagnóstico.

Es un microorganismo de crecimiento dificultoso y se debe disponer de medios de cultivos selectivos y enriquecidos para su recuperación.

Su recuperación, ya sea de la úlcera o del aspirado de ganglios supurados, confirma el diagnóstico.

Una vez que el microorganismo ha penetrado a través de discontinuidades del epitelio durante el contacto sexual con una persona infectada, se ubica en las proximidades de neutrófilos y macrófagos evadiendo la fagocitosis.

La úlcera genital, característica de esta infección, es una lesión dolorosa y puede llegar, por unión con otras úlceras, a formar úlceras gigantes.

En el diagnóstico diferencial, figuran la sífilis primaria, herpes genital, linfogranuloma venéreo y condilomas de la sífilis secundaria.

Cuando la infección es concomitante con el VIH, puede aparecer un mayor número de úlceras y prolongarse en el tiempo.

La clínica y el tratamiento ■ mabel rinaldi

Supuraciones urogenitales: sindrome caracterizado por la presencia de secreción variable cualitativa y cuantitativamente, por los genitales externos, asociado a síntomas que varían entre dolor, ardor y prurito, junto con un laboratorio que demuestra inflamación.

El síndrome inflamatorio uretral se documenta sobre la base de alguno de los siguientes síntomas y signos:

- Secreción purulenta o muco-purulenta.
- Demostración de 5 o más leucocitos, en la secreción uretral, o 10 o más leucocitos en la primera porción de orina (400 X).

Etiología

Las causas que pueden producir un síndrome de secreción urogenital se pueden dividir: en causas no infecciosas e infecciosas.

Causa no infecciosa: es infrecuente y pueden clasificarse de la siguiente forma:

- Físicas: cuerpo extraño, irritación extrínseca (ropa ajustada), radiaciones y viajes prolongados.
- Químicas: lociones, jabones y desodorantes íntimos.
- Hormonales: embarazos, anovulatorios, disfunciones endocrinas (vaginitis atrófica)
- Enfermedades locales: liquen plano, pénfigo, tumores y heridas.
- Higiene deficiente.

Causas infecciosas: son las más comunes, siendo las principales las enfermedades de transmisión sexual.

De éstas, tienen importancia destacada los patógenos: *Neisseria gonorrhoeae* y *Clamydia trachomatis* y *Treponema pallidum.*

Las otras bacterias involucradas pueden ser: *Micoplasmas* spp., *Gardnerella vaginalis,* Complejo GAM o GAMM, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes.*

Infección por *Neisseria gonorrhoeae*

La uretritis por *Neisseria gonorrhoeae*, también llamada blenorragia, es la más conocida y una de la más frecuentes en nuestro país.

Se caracteriza por comprometer el epitelio columnar y de transición del tracto urogenital y en ocasiones puede afectar otros sitios anatómicos por diseminación local o hematógena (tiene preferencia por epitelios cilíndricos o transicionales (uretra, vagina de la prepúber, cérvix uterino, canal anal, faringe y conjuntiva).

Esta bacteria produce infección humana solamente y se transmite por actividad sexual en el adulto y en el neonato en el pasaje por el canal de parto.

Factores propios del germen o del huésped pueden condicionar infecciones más altas y severas como así también el compromiso de otros órganos: articulaciones, válvulas cardiacas.

Como en otras Infecciones de Trasmisión Sexual (ITS) la incidencia y prevalencia son mayores en los adultos jóvenes (18-24 años), en individuos que carecen de pareja estable, en quienes pertenecen a los niveles socioeconómicos más bajos, en los que viven en las grandes ciudades y en aquellos cuyos hábitos sexuales presentan mayor grado de promiscuidad.

La gonococia predomina en el hombre pero en los últimos años se ha observado casi universalmente un mayor estrechamiento de la relación hombre- mujer de 3-1 a 1,5-1.

Entre las razones que se mencionan para explicar este fenómeno se destaca la mayor participación de la mujer en la llamada revolución sexual y el uso de anticonceptivos orales.

La gonococia en el adulto se adquiere casi siempre por vía sexual.

Las infecciones de localización faringea y rectal son adquiridas por la práctica del coito oral y anal respectivamente, con individuos infectados.

Las infecciones oculares no se deben a transmisión sexual. En el recién nacido se adquieren en el canal del parto y en el adulto a través de los dedos.

Por inoculación directa, mecanismo clásico de infección, se comprometen los sitios habituales: uretra, cuello uterino, faringe, ano y conjuntivas.

La deseminación local desde el foco primario produce en el hombre inflamación de las glándulas de Littré y Cowper, abscesos parauretrales, prostatitis y epididimitis.

La mujer puede presentar bartholinitis, skenitis, anexitis, enfermedad inflamatoria pélvica y perihepatitis.

La deseminación sanguínea ocurre en el 1% de los pacientes no tratados y es más común en los homosexuales varones.

En las mujeres, la infección diseminada compromete diferentes órganos y pueden provocar artritis, manifestaciones cutáneas, meningitis, hepatitis y endocarditis.

> Manifestaciones clínicas

En el hombre la manifestación clínica más común es la uretritis.

Los síntomas y signos se presentan entre los 2 y 7 días del momento del contagio.

La manifestación característica es la secreción uretral purulenta, disuria y polaquiuria.

Es común la forma sintomática a diferencia de las infecciones por *Clamydia trachomatis*, ya que más del 90% de los infectados presentan manifestaciones clínicas definidas.

Menos del 10% permanecen sin síntomas y son precisamente los responsables de la diseminación de la infección: se los denomina portadores asintomáticos.

La mujer experimenta con menos frecuencia signos y síntomas de infección los cuales dependen del sitio afectado.

Por tal motivo, la presencia de signos urinarios bajos traduce compromiso uretral y el flujo cervicovaginal es expresión de cervicitis.

Un grupo importante de mujeres que concurren al consultorio de Infecciones de Trasmisión Sexual (ITS) se encuentran asintomáticas, pero solicitan la entrevista médica por tratarse de contactos de hombres con uretritis gonocócica.

Otro grupo menos frecuente, presentan en el momento de la consulta, alguna complicación local como: endometritis, salpingitis y pelviperitonitis.

Las secuelas de la gonococia superior son:

- Enfermedad pélvica inflamatoria.
- Embarazo ectópico.
- Infertilidad.

La infección rectal, habitualmente asintomática, es común en homosexuales que efectúan coito anal receptivo (90%).

En mujeres con infección urogenital se presenta también en 4 a 40% de los casos.

La infección faringea raramente produce síntomas. Cuando están presentes corresponden a los observados en una faringitis aguda.

Se produce por contacto sexual orogenital y se observa en alrededor del 20% de los homosexuales del sexo masculino y en el 10% de las mujeres.

La forma diseminada de infección es más frecuente en mujeres y en homosexuales varones, ya que en ellos las manifestaciones clínicas son escasas o nulas, lo cual motiva un tratamiento tardío.

La gonococia tiene un nivel de contagiosidad estimado en un 60-90% para la mujer y un 20-40% para el hombre.

El riesgo de adquirir la infección se incrementa con el número de contactos y las localizaciones anatómicas implicadas en la relación sexual.

La existencia de individuos asintomáticos, justifica su investigación en otras enfermedades de transmisión sexual y el tratamiento de los contactos del paciente índice.

> Relación con el VIH

No se ha demostrado que la infección por el VIH modifique la evolución natural de la gonococia baja, aunque en África las mujeres tienen más probabilidades de desarrollar enfermedad inflamatoria pélvica con mayores complicaciones y pueden manifestarse aún sin elevación de los leucocitos sanguíneos.

En pacientes con VIH/SIDA la infección por *N. gonorrhoeae* presenta buena respuesta al tratamiento antibiótico.

Los pacientes con uretritis, en especial la gonocócica, tienen mayor concentración de virus VIH en semen.

El tratamiento adecuado de la uretritis gonocócica disminuye la secreción del virus VIH.

La carga del virus VIH en la secreción uretral no se correlaciona con la carga viral plasmática, ni con el recuento de linfocitos CD4+.

> Diagnóstico

Las manifestaciones clínicas cuando están presentes, no son suficientes para hacer el diagnóstico etiológico definitivo, puesto que no todas las uretritis purulentas en el varón son de origen gonocócico.

Además, es común que la mujer no presente síntomas o que estos sean mínimos; similar comportamiento ocurre en las infecciones faríngeas y rectales.

Por tal motivo, el diagnóstico confirmatorio debe realizarse por medio de la tinción de Gram y por cultivo de las secreciones.

El examen directo es un método de diagnóstico rápido, económico, de fácil realización y de alta sensibilidad, sólo en el varón.

Le permite al médico iniciar el tratamiento específico, sin necesidad de conocer el resultado del cultivo, en las siguientes circunstancias:

- Cuando se observen en la muestra, la presencia de diplococos gramnegativos, dentro de los polimorfonucleares, este hallazgo tiene sensibilidad y especificidad de estar frente a una infección gonocócica aguda muy elevada (95%) en el varón.
- Cuando se encuentren diplococos gramnegativos intraleucocitarios y extraleucocitarios.

Sí el examen directo es negativo y existe sospecha clínica suficiente, se debe esperar el cultivo que es el método diagnóstico de mayor sensibilidad.

En la infección de las faringes, cervix y del recto, el único método diagnóstico que se debe considerar en estas localizaciones es el cultivo.

Se debe realizar siempre la detección de cepas de *N. gonorrhoeae* productoras de ß-lactamasa, enzima que inhibe la acción de penicilina.

Las cepas productoras de ß-lactamasa son conocidas desde 1976, están en aumento y constituyen en la actualidad un problema mundial importante.

Diagnóstico diferencial debe hacerse con la infección por *Chlamydia trachomatis* principal causa de la uretritis no gonocócicas.

También deben tenerse en cuenta otras causas de uretritis no gonocócicas como *Micoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum, Trichomonas vaginalis, Gardnerella vaginalis* y *Corynebacterias.*

Dada la probable existencia de sífilis y gonococia y el efecto abortivo para sífilis del tratamiento antigonocócico, se recomienda realizar siempre VDRL, al iniciar la terapia y a las 4-6 semanas de su finalización.

> Evolución y pronóstico

La uretritis gonocócica no tratada puede autolimitarse y el paciente se recupera espontáneamente sin secuelas.

En ocasiones puede ocurrir la diseminación local y hematógena ya señalada.

Cuando se efectúa el tratamiento adecuado, la curación es la regla.

En las formas clínicas el tratamiento es más prolongado y requiere la colaboración de un médico infectólogo.

Siempre se debe tener en cuenta la coinfección con *Chlamydia trachomatis*.

El 40-50% de las uretritis son ocasionadas por ambos gérmenes.

> Tratamiento

> Uretritis

En 2012 se han publicado la guía CDC y la guía europea de diagnóstico y tratamiento de infección gonocócica con importantes cambios en los siguientes aspectos.

Infección por ***Neisseria gonorrhoea*** no complicada de uretra, cervix, recto y faringe, cuando se desconoce la sensibilidad a antibióticos se recomienda la combinación de una inyección intramuscular de **ceftriaxona 500 mg y azitromicina 2g** por vía oral en una única toma.

Actualmente se recomienda acreditar la curación a través de cultivo de control para asegurar la erradicación de la infección e identificación de la aparición de resistencias emergentes,

- Se recomienda ademas identificar, verificar y comunicar los fracasos terapéuticos con las pautas de tratamiento recomendado:

Ceftriaxona 500 mg I.M (monodosis) mas azitromicina 2 g por via oral y en monodosis.

Tratamiento alternativo: cefixima 400 mg dosis única más azitromicina 1 g o doxiciclina 100 mg cada 12 hs x 7 días (se debe garantizar la realización de nueva toma de cultivo una semana posterior a la culminación del tratamiento)

Debido a las comunicaciones permanentes de aumento de resistencia de *Neisseria gonorrhoea* a las cefalosporina no se recomienda el uso de cefixima como droga única y se debe administrar cuando no se disponga de ceftriaxona y siempre asociada a azitromicina o doxiciclina

Cefixima tiene un espectro antimicrobiano similar a ceftriaxona, pero la dosis oral de 400 mg no provee tan altos y persistentes niveles como la ceftriaxona a 250 mg.

En Argentina se contempla como régimen alternativo a cefuroxima con una eficacia de curación clínica de alrededor de 60 % régimen que en mi opinión personal no debería considerarse basada en que un régimen terapéutico efectivo debe lograr como mínimo una eficacia clínica de curación del 90 %

Varones y mujeres con mayor riesgo o riesgo especial para contraer infección simultánea por *N. gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis,* lo presentan las prostitutas, homosexuales y heterosexuales promiscuos.

Infección por *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia trachomatis produce infecciones genitales de espectro clínico variable. La mayoría de las infecciones son asintomáticas, en ambos sexos.

En la mujer es capaz de ocasionar síndrome uretral, uretritis, bartolinitis, cervicitis, infecciones del tracto genital superior, peri hepatitis y artritis reactivas.

- Las infecciones severas pueden ocasionar secuelas como:
- Enfermedad inflamatoria pelviana.
- Embarazo ectópico.
- Infertilidad.

En la mujer embarazada la infección por *Chlamydia trachomatis* puede causar: amenaza de parto prematuro, rotura prematura de membranas, bajo peso neonatal, muerte neonatal y endometritis pos parto.

El neonato tiene elevado riesgo de adquirir infección en forma de conjuntivitis o neumonía. En el hombre produce uretritis no gonocócica, epididimitis, proctitis, proctocolitis, conjuntivitis, síndrome de Reiter, infertilidad y prostatitis crónica.

Como en todas las ITS se observan más frecuentemente en solteros sexualmente activos, con un predominio amplio en hombres heterosexuales y con buen nivel socioeconómico.

Chlamydia trachomatis es una bacteria de características particulares a causa de su localización intracelular obligada. Esto hace imprescindible que la toma de la muestra incluya material celular para su aislamiento.

El síndrome uretral agudo, cuando está presente, puede sugerir la infección por este microorganismo, ya que es responsable del 40% de los casos.

En la mujer es común el compromiso de la uretra y de las glándulas de Bartholino, pero también puede comprometer al endometrio, trompas de Falopio y ovarios.

El aislamiento de esta bacteria en la faringe y en el recto se correlaciona con el coito oral y anal . Estas localizaciones la presentan un 4% de las mujeres con compromiso genital.

> Tratamiento

Se deben utilizar antibióticos con actividad reconocida como: tetraciclina y doxiciclina 100 mg c/12 h durante 7 días o bien azitromicina 1 g oral en dosis única.

En un trabajo aleatorio se demostró que tetraciclina y doxiciclina consiguen curación en más del 95% de los casos, tanto en varones como en mujeres no gestantes, por lo cual estas son consideradas drogas de primera elección.

La eritromicina y el cotrimoxazol son drogas alternativas.

Las nuevas quinolonas (ofloxacina y ciprofloxacina) son comparables a las tetraciclinas pero más onerosas.

La roxitromicina tiene actividad similar a la de la eritromicina.

En gestante amoxicilina 500 mg cada 8 h durante 7 días es tan efectiva como eritromicina 500 mg cada 6 h por 7 días.

En los casos de recurrencia o de compromiso prostático puede estar indicada una duración mayor (4 a 6 semanas).

Esquema de tratamiento por vía oral

Primera elección	tetraciclina	500 mg c/ 6 h	7- 10 días
	doxiciclina	100 mg c/ 12 h	7- 10 días
Segunda elección	eritromicina	500 mg c/ 6 h	7-10 días
ofloxacina	200mg c/12h	7-10 días	
ciprofloxacina	250mg c/12h	7-10 días	
Mujer embarazada	amoxicilina	500 mg c/ 8 h	7-10 días

Infección por complejo GAM

Infeción sinérgica producida por *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Mobiluncus* spp. y *Mycoplasma hominis* (Complejo GAM-M). Puede estar presente en la vagina y no producir síntomas (portación asintomática) pero es causa frecuente de vaginosis bacteriana y más raramente de otras infecciones.

Sí bien la vaginosis bacteriana constituye la manifestación clínica más frecuente de la infección por estos microorganismos, su papel patogénico al igual que para las infecciones del tracto urinario, no es conocido.

Su importancia sí es destacada en la embarazada por su capacidad para adherirse a las células del tracto urinario y de la vagina que es considerada en la actualidad un mecanismo importante y que se vincula a parto prematuro, recién nacido de bajo peso, rotura prematura de membrana, corioamionitis, endometritis y enfermedad inflamatoria pelvica.

Además la infección por vaginosis bacteriana se vincula como predictor de infección por *Neisseria gonorrhoeae* y *Clamydia trachomatis* en mujeres embarazadas y no embarazadas.

> Manifestaciones clínicas

El complejo GAM-M puede producir:

- Vaginosis bacteriana.
- Infección urinaria.
- Bacteriemia.
- Corioamionitis y endometritis.
- Enfermedad inflamatoria pélvica.

Sin lugar a dudas, la vaginosis bacteriana es la más frecuente, y es más común en mujeres con dispositivos intrauterinos.

La vaginosis bacteriana se caracteriza por flujo vaginal maloliente (olor a pescado), prurito, o sensación de ardor o quemazón vaginal.

Habitualmente los exámenes bacteriológicos muestran la presencia de flora anaeróbica asociada.

Rara vez se detectó (0,5 %) en la orina de pacientes internados o la proveniente de la comunidad.

El hallazgo de complejo GAM-M en orina en algunas oportunidades se correlacionan con síntomas.

Se la considera responsable de infección urinaria cuando se acompaña de manifestaciones clínicas en mujeres menores de 45 años o en hombres con grados variables de insuficiencia renal.

La bacteriemia por lo general es de curso benigno y está relacionada con una causa ginecoobstétrica. Su observación en la práctica médica es poco frecuente.

> Tratamiento

El metronidazol es considerada la droga de elección.

Se indica en una dosis de 500mg cada 6 horas por vía oral, durante 7 días o en monodosis diaria de 2 gramos por 2 o 3 días.

El primero de los esquemas es más eficaz porque presenta menor frecuencia de recaídas.

La mujer embarazada tiene las mismas indicaciones de tratamiento que la no embarazada. Se utiliza amoxicilina o ampicilina en dosis habituales durante 7 días

El manejo de los contactos de mujeres con vaginosis bacteriana es controvertido ya que por un lado se indica tratamiento rutinario y por el otro, solo cuando se trata de una infección recurrente.

Úlceras genitales

El diagnóstico de las úlceras genitales presentan dificultades, ya que, por un lado, el cultivo es difícil (*H. ducreyi*) o no existe (*Treponema pallidum* no crece in vitro), requiriendo técnicas de cultivo celulares como el virus de herpes simple o *Calymmatobacterium granulomatis*; por otro lado, cultivos in vitro y las pruebas como el campo oscuro no están disponibles en muchos países y requiere personal entrenado, siendo el diagnostico clínico difícil e insensible.

> Chancro blando

Enfermedad infecto-contagiosa localizada, auto-inoculable, que se adquiere durante las relaciones sexuales.

Es producida por *Haemophilus ducreyi* que provoca lesiones ulcerosas a nivel de los genitales y se acompañan frecuentemente de ganglios regionales supurados, sin participación sistémica.

Está infección tiene predominio en heterosexuales, promiscuos y en personas que practican la prostitución.

Está infección es muy frecuente en áreas tropicales y subtropicales en especial en África, siendo rara su presentación en países industrializados.

Luego de un período de incubación de 2-3 días aparece en el sitio de inóculo una vesico-pústula que rápidamente se rompe y da lugar a pequeñas ulceraciones a partir de la úlcera primaria. Por inoculación se originan múltiples lesiones.

El tamaño de las úlceras varían entre 0,2 a 1,5 cm y son de formas redondeadas con bordes desprendidos y cortados a pico, irregulares con fisura radiada, y rodeada por un halo eritematoso que es considerado patognomónico de esta infección.

El fondo de la úlcera esta cubierta por un exudado amarillento que al ser eliminado deja al descubierto una base irregular, granulosa, sucia, de aspecto apolillado, que sangra con facilidad.

Las ulceraciones son blandas, por la falta de infiltración, dolorosas espontáneamente y sobre todo a la palpación. Es característico el mal olor.

Estas lesiones se resuelven en pocos días y luego aparecen las adenopatías agudas regionales, estas luego se reblandecen dando origen a la adenitis (bubón). Estas lesiones se observan en 30 a 70% de los casos y están en relación directa con la falta de diagnóstico, con tratamiento inadecuado o con importante deterioro nutricional.

Los ganglios se adhieren entre sí como a los planos superficiales y profundos. La piel que la recubre se torna roja violácea. Posteriormente la adenitis, celulitis y peri adenitis se absedan dando salida a una secreción purulenta, espesa y a veces sanguinolenta.

> Diagnóstico

El diagnóstico es clínico y por el descarte de otras patologías con los medios complementarios, la biopsia cutánea y la respuesta terapéutica.

La investigación bacteriológica se hará del borde de las úlceras o por aspiración de los bubones.

> Tratamiento

Curas locales con permanganato de potasio tibio más la administración de algunos de los siguientes antimicrobianos: azitromicina, amoxicilina clavulanico, ciprofloxacina, tetraciclina, trímetoprima sulfametoxazol y ceftriaxona son buenas opciones.

Ceftriaxona	250-500 mg IM en dosis única curación 97-98%
Eritromicina	500 mg VO cada 6 horas durante 7 días
TMP/S	160/800 mg cada 12 h VO por 5-7 días (98% de efectividad)
Azitromicina	1 g VO tiene eficacia del 89%
Ciprofloxacina	500 mg cada 12 h por 3 días. 90% de curación
Amoxicilina/clavulanico	500 mg cada 8 h por siete días tiene una tasa de curación 90%

El laboratorio ■ marina quiroga

Las infecciones del tracto genital tanto femenino como masculino son causadas por una amplia variedad de microorganismos.

Algunas infecciones son causadas por organismos exógenos que ingresan por contacto sexual o ITS, como sífilis y gonorrea, entre la bacterianas, o tricomoniasis causada por el parásito *Trichomonas vaginalis* o durante procedimientos médicos (infecciones iatrogénicas) mientras que otras están provocadas por microorganismos que habitualmente están presentes y forman parte de la población bacteriana genital normal de la mujer (infecciones endógenas como vaginosis bacteriana). Esta denominaciones reflejan la forma en que son adquiridas y como se propagan.

En las mujeres, las infecciones endógenas son las más comunes, mientras que en los hombres las ITS son las predominantes.

La evaluación microbiológica de las infecciones del tracto genital femenino, en especial las del tracto inferior, habitualmente implican la separación del presunto agente etiológico de la población bacteriana vaginal o cervical normal. Su diagnóstico adquiere importancia porque se encuentran entre las causas más importantes de morbi-mortalidad tanto materna como neonatal, estando asociadas a complicaciones graves como infertilidad, embarazo ectópico, enfermedad pélvica inflamatoria (EPI), parto prematuro, aborto espontáneo, muerte fetal, infecciones congénitas, aumento en el riesgo de adquirir o de transmitir el VIH/SIDA, entre otras.

Las infecciones del tracto genital masculino también pueden generar múltiples consecuencias. Si bien muchas infecciones son autolimitadas y una gran parte asintomáticas, pueden dar lugar a uretritis, epididimitis, prostatitis, entre otras, o infecciones crónicas acompañadas de inflamación persistente ocasionando, finalmente, alteraciones en la fertilidad por daño directo de la célula espermática o de su nicho.

A continuación, se tratarán las ITS bacterianas más frecuentes, no así las causadas por hongos, virus o parásitos.

Recomendaciones e Instrucciones para la recolección de la muestra de infecciones genitales

Las muestras genitales mal recogidas, o poco representativas o con pocas células, de volumen escaso, en recipientes no adecuados, mal conservadas o remitidas u obtenidas después de iniciado el tratamiento antimicrobiano, conducen a errores diagnósticos.

Se debe tener especial cuidado, no solo en la toma de muestra adecuada, su transporte y conservación sino también en realizar una adecuada anamnesis ya que existen variaciones individuales de la población bacteriana habitual entre pacientes (hábitos sexuales, ciclo menstrual, embarazo, hospitalización, cirugías, edad, inmunosupresión, entre otras).

Es por ello que el diagnóstico bacteriológico debe realizarse no solo en base a los datos obtenidos del estudio de la muestra sino también de los datos clínicos-epidemiológicos de los pacientes, los que permitirán realizar la interpretación correcta de los resultados.

La privacidad y confidencialidad son esenciales, es especial en condiciones potencialmente estigmatizantes como las ITS. Los adolescentes, por ejemplo, muchas veces no consultan porque temen recibir críticas o desaprobación por parte de los prestadores de salud, y que incluso podrían revelar información a sus padres o mayores. Los pacientes deben ser tratados con el mismo respeto en todos los casos, aunque se haya detectado o se sospeche una ITS, e independientemente de la edad o estado civil.

Entre los datos clínicos-epidemiológicos útiles para la evaluación diagnóstica de las ITG se encuentran:

Edad del paciente: la población bacteriana femenina se modifica en los distintos períodos de la vida (neonatal, primera y segunda infancia, menarca, años reproductivos, embarazo, menopausia).

Uso de antimicrobianos: los antimicrobianos, tanto tópicos como sistémicos, alteran el equilibrio de la población bacteriana, seleccionando microorganismos resistentes y levaduras.

Uso de tampones, toallas higiénicas durante el ciclo menstrual o protectores diarios: pueden alterar la población microbiana habitual aumentando la prevalencia de algunos microorganismos como *Staphylococcus aureus* (probablemente provocado por la colocación manual de tampones) o enterobacterias (en especial en las que usan toallas higiénicas ó protectores diarios por colonización con bacterias de la flora fecal como *Escherichia coli*).

Cirugías ginecológicas o urológicas previas: todo traumatismo quirúrgico altera la ecología de la población bacteriana habitual, aumentando la prevalencia de diversos microorganismos y, en la mujer, disminuyendo los lactobacilos.

Ciclo menstrual: parte de la población microbiana habitual se modifica durante el ciclo, al igual que el pH que se incrementa.

Embarazo: durante el embarazo aumenta la colonización por lactobacilos y por levaduras por aumento del glucógeno celular. En el puerperio, período crucial para la instalación de infecciones del tracto genital superior, la presencia de sangre y loquios favorecen la presencia de anaerobios y enterobacterias, disminuyendo los lactobacilos.

Relaciones Sexuales: el tipo de relación sexual: vaginal, anal, oral, es un dato importante para investigar diferentes localizaciones, por ejemplo buscar lesiones compatibles con chancros sifilíticos. En la mujer, el líquido seminal produce un aumento transitorio del pH vaginal, siendo importantes para la transmisión de *Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis* u otros microorganismos. Algunos autores refieren que el número de relaciones sexuales por semana y el número de parejas sexuales (3 ó más a lo largo de la vida) aumenta el riesgo de adquirir vaginosis bacteriana.

Métodos anticonceptivos el dispositivo intra-uterino (DIU) puede aumentar la reacción inflamatoria en el endocérvix y el pH vaginal. Uno de los microorganismos implicados en las infecciones de las mujeres que usan DIU ha sido *Actinomyces israelii*, el que puede ser parte de la población microbiana normal pero la presencia de DIU favorecería la colonización e infección del endometrio. Las jaleas espermicidas, por el cambio de pH, provocan modificaciones en la ecología vaginal, mientras que los anticonceptivos orales favorecen el desarrollo de una microbiota vaginal semejante a la observada durante el embarazo pudiendo posibilitar las infecciones por levaduras. También ha sido informado, que el uso de preservativos puede producir respuesta inflamatoria atribuida, en principio, a cierto tipo de espermicidas (nonoxinol-9) que pueden actuar como irritantes o alérgenos sobre una mucosa húmeda y no queratinizada como la mucosa vulvar.

Patologías de base por ejemplo, la diabetes y los tratamientos crónicos o prolongados con corticosteroides pueden aumentar el riesgo de candidiasis.

Uso de detergentes, desinfectantes y agentes de higiene o secado vaginales que pueden afectar la población bacteriana normal y provocar el crecimiento de otros microorganismos.

Ante la solicitud de un examen de flujo vaginal se debe instruir a la mujer que debe concurrir al laboratorio:

- Sin colocarse tabletas vaginales
- Sin hacerse lavajes internos (bidet u otra ducha vaginal con agua de abajo hacia arriba), 12 horas antes
- Sin tener relaciones sexuales 48 hs. antes (por el efecto sobre la ecología microbiana que podría producir el líquido seminal, que presenta un pH elevado y una alta concentración de zinc y fructosa)

Al hombre, previamente a la toma de muestra se lo debe instruir de

- No orinar, al menos en las 3 hs previas a la toma de muestra si tienen síntomas de uretritis pero no presentan secreción (ya que el estudio se realizará sobre el primer chorro de orina)
- No tener relaciones sexuales 48 hs. antes (minimiza la contaminación con microorganismos de la población bacteriana habitual o transitoria de la pareja sexual) o 72 hs si el estudio está orientado al diagnóstico microbiológico de prostatitis bacteriana aguda (para aumentar la concentración en las vías espermáticas y glándulas anexas de los posibles agentes etiológicos).

Toma de muestra

Las muestras que se utilizan para el diagnóstico de ITG varían según el tipo de infección involucrada y el sexo del paciente. En cualquier caso, siempre se debe buscar evidencia de otras infecciones genitales; ya que las infecciones múltiples son comunes.

En pacientes del sexo femenino, si se requiere realizar el estudio de infecciones vaginales, se procede:

En niñas: Recoger la secreción vulvovaginal.

En mujer adulta: Se debe recoger la muestra con la ayuda de un espéculo, evitando el uso de lubricantes ya que la mayoría de ellos resultan bacteriostáticos, con buena luz y la paciente ubicada en posición ginecológica.

Tener en cuenta que los microorganismos que pueden producir patología se localizan en diferentes sitios: algunos de ellos lo hacen en el epitelio estratificado, mientras que otros sólo pueden establecerse en el epitelio columnar del endocervix o en la zona límite entre ambos.

Microorganismos que se localizan en el epitelio estratificado (saco vaginal): complejo GAMM (*Gardnerella vaginalis*, anaerobios, *Mobiluncus* spp., *Mycoplasma* spp.), *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae*, entre otros.

Microorganismos que se localizan en el epitelio columnar (endocérvix): *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma* spp., *Listeria monocytogenes*.

Por ello, se deben utilizar dos hisopos diferentes:

1º Hisopo (obtenido de fondo de saco vaginal): recoger las secreciones del fondo de saco vaginal, colocar en un tubo estéril y rotular correctamente. (Se utilizará para investigar la presencia de parásitos, levaduras, vaginosis bacteriana, determinación del pH y del test de aminas)

2º Hisopo (obtenido de cuello de útero): limpiar el cuello de útero (endocérvix) para que quede libre de secreciones y mucus vaginales. Insertar el hisopo algunos milímetros dentro del canal cervical y obtener el exudado, colocarlo en un tubo estéril (distinto al anterior) y rotular correctamente. (Se utilizará para investigar la presencia de gonococos, micoplasmas, etcétera)

De haberse solicitado el estudio de *Chlamydia*, utilizar un tercer hisopo, adecuado para tal fin (de dracon, alginato de calcio o poliéster) ya que el algodón atenta contra la recuperación y viabilidad de los microorganismos y el soporte de madera desprende productos tóxicos al ponerse en contacto con el medio de transporte.

Insertar el hisopo en el canal cervical y rotar a fin de obtener células cervicales. No se debe trabajar con secreciones ya que como ha sido referido en este capítulo, *Chlamydia* es un microorganismo intracelular. Si se desea estudiar una infección de la uretra femenina, se utiliza el hisopado endouretral, introduciendo el hisopo 1 a 1,5 cm y raspando las paredes de la uretra.

En otras infecciones del tracto genital femenino:

- Para estudio de infecciones en glándula de Bartolino, endometrio, fondo de saco de Douglas; trompas de Falopio y líquido amniótico, se deberá solicitar muestra obtenida por Punción-Aspiración (PAS)
- Para el estudio del dispositivo intrauterino, se solicitará el envío del dispositivo completo obtenido por extracción quirúrgica.

En pacientes del sexo masculino, la muestra a tomar debe ser de acuerdo a la patología que se sospeche

Sospecha clínica	Muestra
Uretritis gonocócica	Secreción uretral y/o 1er.chorro miccional
Uretritis no gonocócica (UNG)	Secreción uretral y/o 1er.chorro miccional
UNG asociada a clamidias	Raspado uretral (introducir el hisopo o cureta oftalmológica 3 a 4 cm) y/o 1er. chorro miccional
Epidídimo	Punción-aspiración
Prostatitis	Secreción prostática
Infertilidad masculina	1er chorro y esperma

Se considera que entre el 50% y el 70% de los casos de uretritis son uretritis no gonocócicas (UNG). La UNG se puede definir como una inflamación de la uretra masculina no causada por *N. gonorrhoeae* y que se acompaña de descarga que puede o no ser mucopurulenta, irritación y/o disuria. Los agentes etiológicos bacterianos aceptados de UNG son: *C. trachomatis,* Complejo GAM*, Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis, Mycoplasma spp.,* enterobacterias, anaerobios, entre otras.

El hallazgo de numerosos polimorfonucleares y ausencia de gérmenes sugiere, en la mayoría de los casos, una uretritis de las llamadas inespecíficas

Secreción uretral: se extrae la muestra recomendando al paciente retraer el prepucio hacia atrás y volver hacia adelante con un suave masaje para facilitar la mayor salida de secreción. La misma se recogerá con ansa o hisopo estéril.

Raspado uretral: introducir 3 a 4 cm en la uretra un hisopo adecuado para el diagnóstico de clamidia (de dracon, alginato de calcio o poliéster) o cureta oftalmológica. Raspar a fin de obtener células.

Primer chorro miccional: en caso de que la secreción uretral sea escasa o nula o de no poder realizar un raspado uretral, se recogerá muestra de orina. Para lo cual, se recomienda obtener el primer chorro miccional de la mañana (entre 5-10 ml) con prepucio retraído, previa higiene profunda de genitales externos.

Secreción prostática: la muestra para el estudio de prostatitis la extrae el urólogo debiendo realizar un masaje prostático por vía rectal. Para el diagnóstico general se recomienda realizar la técnica de Meares y Stamey que incluye muestras de primer chorro de orina, orina del chorro medio, secreción prostática, orina pos masaje prostático y espermocultivo. Como

método de tamizaje (*screening*) se puede trabajar solo con dos muestras: primer chorro de orina y espermocultivo.

En prostatitis, los agentes etiológicos reconocidos son diferentes géneros de la familia *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Morganella morganii*, entre otros) y *Pseudomonas* spp. Los cocos gram positivos son considerados como probables agentes etiológicos mientras que los clásicos microorganismos asociados a ITG (*Neisseria*, por ejemplo) como posibles agentes.

Tener en cuenta que en hombres mayores de 35 años, *E. coli* y otras bacterias (enterococos, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*) pueden causar epididimitis. Mientras que en hombres menores de 35 años son más frecuentes, entre las infecciones bacterianas, las causadas por clamidia, gonococo, y *U. urealyticum*. En testículo, como etiología bacteriana frecuente encontramos *M. tuberculosis*. Si se sospecha infección tuberculosa, no es válida solamente la coloración de Ziehl-Nielsen con el material obtenido, puesto que la presencia de *Mycobacterium smegmatis* es muy frecuente. Sí, se exige el cultivo para *M. tuberculosis*.

Espermocultivo: de ser solicitado el estudio de semen, la muestra la toma el paciente por masturbación luego de haber orinado y de haber lavado el pene con jabón y secado con una toalla limpia. La muestra (todo el material) se recoge en recipiente estéril y se transporta al laboratorio inmediatamente sin refrigerar.

Para la interpretación de los resultados, recomendamos la lectura del Primer Consenso Argentino sobre Infecciones de las Vías Espermáticas y Glándulas Anexas en Infertilidad elaborado en el año 2002 por la Sociedad Argentina de Andrología y la Asociación Argentina de Microbiología (disponible *on-line*).

En ambos sexos

Muestras rectales: para el estudio de gonococia rectal, introducir el hisopo a través del esfínter anal unos 3 cm y rotar contra las criptas rectales. Evitar el contacto con materia fecal, lo que invalidaría la muestra, obligando a una nueva toma. Si se sospecha proctitis por clamidia, se deben emplear hisopos adecuados de dracon, alginato de calcio o poliéster, por las razones ya mencionadas.

Muestras faríngeas: para investigar la presencia de gonococo y/ o clamidia.Utilizar un baja lengua. Frotar vigorosamente con un hisopo las

zonas tonsilares, faringe posterior y zonas ulceradas, inflamadas o con exudados purulentos.

Ulceras genitales: ante la observación de lesiones compatibles con sífilis (chancro) se tomará muestra del exudado de la lesión. Para ello, limpiar la superficie con solución salina y eliminar la costra si la hubiere. Raspar la lesión hasta que fluya líquido seroso. Limpiar. Tratar de evitar el sangrado. Presionar la base de la lesión hasta que fluya un líquido claro. Tocar suavemente el líquido con un portaobjeto y cubrir con un cubreobjetos. Examinar inmediatamente al microscopio de campo oscuro.

Si la lesión orienta al diagnóstico de chancro blando y de requerirse el cultivo de *Haemophilus ducreyi*, se debe aspirar el líquido de la úlcera (chancroide) evitando el sangrado.

Ante la sospecha de linfogranuloma venéreo (LGV), se debe aspirar la úlcera (o realizar una punción de la adenopatía y aspirar su contenido).

En caso de sospecha de infección gonocócica diseminada se deben realizar hemocultivos.

Transporte y conservación de las muestras

Si la muestra fue extraída en el laboratorio, la siembra en los medios de cultivo apropiados debe ser realizada de inmediato.

Si la muestra ha sido obtenida con hisopo o ansa y de no ser posible el cultivo inmediato, se puede conservar una hora como máximo, colocando el hisopo o el material tomado con ansa en 0,5 ml de agua estéril. No colocar en frío.

En caso de existir demora en llegar al laboratorio, cada uno de los hisopos se colocarán en medio de transporte (se aconsejan el de Stuart o el de Amies).

El medio de transporte se deberá mantener a temperatura ambiente, y las muestras se deberán procesar en un lapso no mayor a 12 hs a fin de preservar la viabilidad de microorganismos susceptibles a las condiciones adversas, como los gonococos.

Para el caso de muestras de orina, secreción prostática o semen, transportarlo al laboratorio a la mayor brevedad posible a temperatura ambiente (NO refrigerar). El primer chorro de orina se centrifuga inmediatamente (a 1000 rpm durante 10 minutos) en dos tubos estériles, uno para cultivo y el otro para bacterioscopía.

Para el estudio de micoplasmas, las muestras (obtenidas con hisopo ó las muestras líquidas) se deben procesar de inmediato ó colocarse en un medio de transporte adecuado (puede ser Stuart reducido ó el provisto por el fabricante si se usan equipos comerciales de diagnóstico), el que puede conservarse a temperatura ambiente (18º a 25ºC) durante 8 horas, o a 2º a 8ºC durante 16 horas.

Para el estudio de clamidias, las muestras pueden almacenarse secas a temperatura ambiente durante un máximo de 24 horas. Si se requiere un almacenamiento más prolongado, pueden conservarse hasta 5 días a temperatura de 2º a 8ºC. NO congelar los hisopos después de recoger la muestra, excepto si el diagnóstico se realizará por cultivo celular (en ese caso se conservaran las muestras a - 70ºC).

Para el cultivo de *H. ducreyi*, la muestra inmediatamente después de obtenida debe colocarse en un medio de transporte a base de hemina y tioglicolato con L-glutamina, fracción V de albúmina bovina y vancomicina (3 mg/L), que permite una supervivencia del microorganismo entre 24 horas y 7 días a 4ºC. También puede utilizarse un medio de transporte (tipo Stuart o Amies) que confiere una supervivencia entre 2-4 horas, pudiendo prolongarse hasta 24 horas si se refrigera a 4ºC.

Las muestras obtenidas por punción-aspiración (PAS) se conservan a temperatura ambiente (en la jeringa con aguja obturada con tapón de goma o caucho) y deben ser procesadas lo más rápidamente posible.

Procesamiento de las muestras

> Examen general de las muestras de origen vaginal

Un flujo vaginal de pH elevado no abundante, color grisáceo, olor fuerte, nos hace presumir la presencia de población microbiana anaeróbica o *T. vaginalis* o vaginosis bacteriana por complejo GAM (*Gardnerella* -Anaerobios-*Mobiluncus*).

Un flujo vaginal de características acuosas, blanquecino, abundante, espumoso, nos hace presumir la presencia de *T. vaginalis.*

Un flujo vaginal blanquecino, de consistencia caseosa (semejante al queso) nos hace presumir la presencia de hongos (por ej. *Candida* spp.).

> Determinación del pH de la muestra

El pH se debe tomar en el momento de la toma de muestra, al lado del paciente, con cintas de pH con un rango que permita diferenciar entre el pH habitual esperado según los datos clínicos-epidemiológicos de la paciente (por ejemplo mujer fértil pH habitual <4,5).

> Examen microscópico en fresco

Es muy importante realizarlo con detenimiento (en 400X) y a la mayor brevedad posible puesto que la desecación o el cambio de temperatura pueden afectar la movilidad de *T. vaginalis* y dificultar así, su observación

Del hisopo obtenido de fondo de saco posterior, SIEMPRE hay que valorar:

- Presencia o no de *T. vaginalis*, ya que aportamos un elemento diagnóstico.
- Presencia o no de elementos levaduriformes y pseudomicelios, compatibles con *Candida* spp.
- Presencia a no de células clave (*clue cells*), también denominadas células guía, que es uno de los elementos diagnósticos de vaginosis bacteriana por complejo GAM. Es importante no confundirlas con células epiteliales recubiertas de lactobacilos firmemente adheridos a las células vaginales.
- Respuesta inflamatoria positiva (10 ó >10 leucocitos PMN por campo 400X) ó negativa (< de 10 PMN/campo 400X).
- Test de aminas (con OHK al 10%)

Del hisopo obtenido de endocérvix, SIEMPRE valorar:

- Respuesta inflamatoria positiva (10 ó >10 leucocitos PMN por campo 400X) o negativa (< de 10 PMN/campo 400X).

> Examen microscópico previa coloración de Gram

La coloración de Gram se realiza, tanto del hisopo obtenido de fondo de saco posterior como de endocérvix.

Se deberá valorar:

- Presencia o ausencia de población bacteriana lactobacilar (Figura 1)

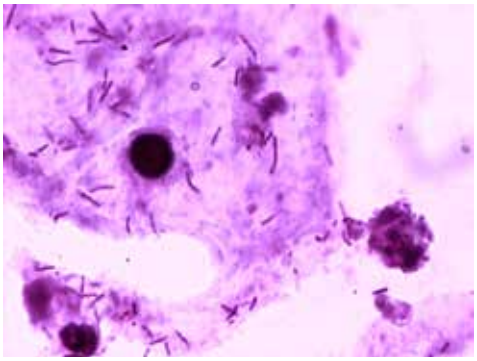


Figura 1. Flujo vaginal. Se observa la presencia de abundantes lactobacilos.

- Presencia o ausencia de población bacteriana compatible con complejo GAM
- De observarse un desplazamiento en la población bacteriana (por ejemplo solo bacilos gramnegativos) deberá informarse.

En el sexo femenino, el hecho de observar diplococos gramnegativos extra o intracelulares, no nos permite hacer un diagnóstico de infección gonocócica puesto que un pequeño porcentaje de mujeres adultas presentan bacterias con estas características que no son *N. gonorrhoeae* y que se encuentran como parte de su microbiota normal, mientras que en niñas es frecuente la presencia de *Veillonela,* microorganismo morfológicamente idéntico a *Neisseria*. En consecuencia, y como ya fuera mencionado, la investigación bacteriológica de vía genital en la mujer debe realizarse siempre por cultivo.

Examen general de las muestras de origen uretral

> Examen microscópico directo en fresco

Al igual que en las leucorreas este examen nos permitirá observar la presencia de leucocitos, piocitos, parásitos, células tipo guía (que nos recuerdan la presencia de *Gardnerella*), elementos micóticos.

En prostatitis bacteriana aguda, se presenta reacción inflamatoria aunque esta condición no es excluyente.

> Examen microscópico previa coloración de Gram

La búsqueda estará orientada a diplococos gramnegativos de morfología y tinción tipo *Neisseria*, bacilos pleomórficos gramnegativos tipo *Gardnerella* u otra microbiota predominante.

En el hombre, en uretra, es excepcional encontrar microorganismos con la morfología y tinción semejante a *N. gonorrhoeae* y que no sean tales, por lo tanto el examen directo previa coloración de una muestra de uretra masculina con estos hallazgos, y la presencia de una reacción inflamatoria, permite realizar un diagnóstico presuntivo de gonorrea.

> Diagnóstico de vaginosis bacteriana

Entre los signos de la infección por vaginosis bacteriana (VB), se destacan: descarga vaginal parduzca o amarillenta, homogénea, con mal olor, distribuida sobre toda la pared vaginal (signo de la pincelada).

Para el diagnóstico de vaginosis bacteriana, no es necesaria la siembra de la muestra ya que, si bien el cultivo vaginal tiene una alta sensibilidad, su valor predictivo positivo es menor al 50% (se aísla *G. vaginalis* en más del 95% de las mujeres con vaginosis bacteriana, pero también en un 35-55% de las mujeres sin vaginosis).

Los criterios diagnósticos más aceptados son:

> a) Criterios de Amsel y colaboradores

Es diagnóstico de vaginosis bacteriana a complejo GAM, cuando se cumplen **por lo menos tres** de los cuatro criterios siguientes:

1. **secreción homogénea (ausencia o escasos leucocitos):** Esta infección cursa con ausencia o un número reducido de PMN (menos de 10 por campo 400X).
2. **pH vaginal mayor a 4,5:** Tener en cuenta que el pH también puede estar elevado (falsos positivos) ante la presencia de: semen, moco cervical, sangre menstrual, ducha vaginal.
3. **olor a pescado al agregar OHK al 10% (Test de aminas):** La prueba tiene como objeto comprobar que la elevación del pH es debida a la producción de aminas (putrescina, cadaverina y trimetilamina) procedentes del metabolismo anaeróbico. Se realiza colocando una par-

te del exudado vaginal sobre un portaobjeto y dejando caer sobre ella una gota de una solución de HOK al 10%. El olor a "pescado" se siente por la volatilización de las aminas aromáticas a pH francamente alcalino.

4. **presencia de células claves o *clue cells*:** el examen directo nos muestra la presencia de abundantes células epiteliales de bordes indefinidos con gran cantidad de bacilos adosados a sus paredes (células clave o *clue cells*, células guía) y ausencia o escasos leucocitos. (Figura 2)

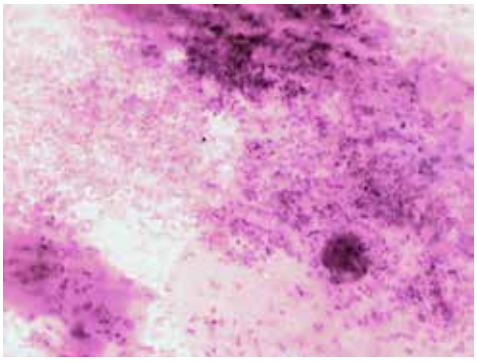


Figura 2. Flujo vaginal. Se observa ausencia de lactobacilos y abundante flora pleomórfica gram negativa adosada a las células epiteliales (clue cells).

Tener en cuenta que células clave existen, o se observan también cuando se trata de infecciones a *T. vaginalis* o vaginosis a predominio de microorganismos bacterianos anaeróbicos.

Tanto el pH como el test de aminas son pruebas muy sensibles para el diagnóstico de VB (más del 95 % de sensibilidad) pero poco específicas ya que una buena parte de las tricomoniasis vaginales el flujo tiene pH > 4,5 y el test de aminas es positivo.

La coloración de Gram nos permitirá observar, la ausencia de *Lactobacillus* spp. y la presencia de células vaginales muy alteradas (a menudo con pérdida de los límites citoplasmáticos y halo claro perinuclear y fundamentalmente, bordes celulares alterados) con masas de cocobacilos gram negativos pleomórficos supracelulares (*Gardnerella*- anaerobios) y pequeños bacilos curvos (*Mobiluncus*). Tener en cuenta que en mujeres menopáusicas es normal la disminución de lactobacilos.

Existen VB en las que las células claves no se observan o no son típicas.

> b) Criterios de Nugent y colaboradores

En este sistema se asigna un valor pre-determinado *score* (del 1 al 10) a los diferentes morfotipos bacterianos observados en una coloración del Gram del exudado vaginal.

La observación se realiza con objetivo de inmersión (1000X) teniendo en cuenta la morfología (morfotipo) y cantidad de bacterias por campo.

Score	*Lactobacillus* (morfotipos)	*Gardnerella* y *Bacteroides* spp. (morfotipos)	Bacilos curvos gram variable
0	> 30	0	0
1	5-30	<1	1-4
2	1-4	1-4	5- >30
3	<1	5-30	-
4	0	>30	-

El criterio se obtiene de la suma de los *score* obtenidos (morfotipos de *Lactobacillus* + morfotipos de *Gardnerella* y *Bacteroides* spp. + bacilos curvos gram variable):

- 7 (siete) ó mayor a 7: población bacteriana vaginal habitual francamente alterada (predominio de anaerobios).
- 4 (cuatro) a 6 (seis): intermedio (disminución de lactobacilos y aumento anormal de otras bacterias habituales)
- 0 (cero) a 3 (tres): normal (mayoría de lactobacilos)
- Un *score* ≥ 7 sin respuesta inflamatoria (respuesta inflamatoria negativa) implica vaginosis bacteriana.

Algunos expertos argentinos proponen el estudio denominado BACOVA (Balance del Contenido Vaginal) basado en el examen en fresco, tinción de Gram y un estudio por coloración de Giemsa, con la finalidad de integrar el panorama biológico de la ecología vaginal. El BACOVA define cinco estados vaginales básicos según los criterios de Nugent y la presencia o no de respuesta inflamatoria. Al asociarlo con la coloración de Giemsa, según estos expertos, permite además aumentar la posibilidad de de-

tección de células indicadoras de alteraciones inflamatorias avanzadas y/o compatibles con estados infecciosos virales o estados proliferativos.

Diagnóstico de gonorrea

Para el diagnóstico de *N. gonorrhoeae*, la técnica de referencia a partir de muestras clínicas de cualquier sitio, tanto en pacientes sintomáticos como asintomáticos, es el cultivo. El cultivo también es la técnica de elección para el diagnóstico de gonorrea en muestras conjuntivales y en casos de abuso sexual.

La observación en fresco de las muestras obtenidas, permite ver generalmente una reacción inflamatoria positiva.

La coloración de Gram es de importancia en el diagnóstico presuntivo de uretritis gonocócica cuando se valoran microscópicamente secreciones uretrales, ya que en hombres sintomáticos alcanza una sensibilidad del 90-95% y una especificidad de 95-100%, presentando una correlación del 99,6% con la detección de *N. gonorrhoeae* mediante hibridación con sondas. (Figura 3)

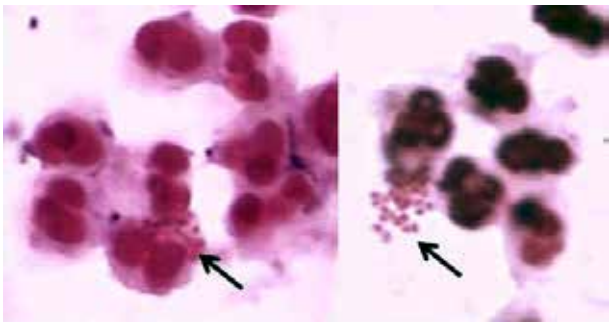


Figura 3. Exudado uretral. Se observan abundantes leucocitos polimorfonucleares y diplococos gram negativos extra e intracelulares.

A diferencia de lo que ocurre en el sexo masculino, la coloración de Gram en muestras endo-cervicales, no posee una sensibilidad adecuada (50-70%), lo que no permite utilizar esta técnica como método presuntivo y es por ello, imprescindible efectuar el cultivo para un correcto diagnóstico.

También, en muestras rectales la sensibilidad de la coloración de Gram es baja por lo que no está recomendada, pudiendo ser útil solamente si la muestra se toma mediante proctoscopio en pacientes sintomáticos

En muestras obtenidas de endocérvix, uretra, recto o faringe, es conveniente realizar la siembra en medios selectivos con factores de crecimiento e inhibidores de la población microbiana habitual.

El medio selectivo de uso general en nuestro país es el agar Thayer-Martin (T-M), el que contiene un elemento que es indispensable para su crecimiento como es el complejo vitamínico B (por la adición de Isovitalex), además del agregado de una mezcla antibiótica (vancomicina, colistin, trimetoprima y nistatina) que inhibe la población microbiana acompañante.

Entre un 3-10% de los gonococos pueden ser cepas auxotróficas. En especial, aquellas deficientes en arginina, hipoxantina y uracilo (auxotipo AHU) son susceptibles a las concentraciones habituales de vancomicina presentes en los medios selectivos, por lo que siempre se deben inocular simultáneamente las muestras en placas de agar chocolate sin inhibidores.

Los aislamientos de *N. gonorrhoeae* son sumamente susceptibles a las condiciones ambientales adversas como temperaturas extremas de frío o calor, atmósfera no enriquecida con CO_2, ausencia de humedad, incubación prolongada.

Por ello, las placas deben ser incubadas a 35ºC a 36ºC en una atmósfera húmeda, enriquecida con CO_2 (3% a 5%) pudiendo utilizarse una incubadora de CO_2 o un recipiente con la vela en extinción en (método de la vela). De utilizar el método de la vela, se debe encender la vela cada vez que el frasco se abra para añadir placas y no usar velas perfumadas cuyos vapores pueden ser tóxicos para las bacterias.

Para mantener la humedad se debe colocar una bandeja plana con agua en el fondo de la incubadora, o una toalla de papel o un pedazo de algodón humedecido en el frasco de vela. Tanto la toalla de papel como el algodón humedecido deben ser reemplazados diariamente para evitar el crecimiento de mohos que puedan contaminar los cultivos.

La incubación se realiza durante 24-48 hs, y las placas se descartan como negativas recién a las 72 horas. Los aislamientos deben ser subcultivados cada 18 a 24 horas.

Se deben subcultivar las colonias semejantes a gonococos de un medio de cultivo primario selectivo (como el T-M) a un medio de cultivo no selectivo, como agar chocolate a fin de obtener un cultivo puro de aislamiento.

Puede hacerse un diagnóstico presuntivo de una cepa aislada de un medio selectivo por la morfología de las colonias, la observación de diplococos típicos (gram negativos) en parejas, tétradas o racimos por coloración de Gram y reacción oxidasa positiva.

Un diagnóstico presuntivo de *N. gonorrhoeae* originalmente aislado de un medio de cultivo no selectivo puede basarse en las características descriptas más una reacción apropiada en por lo menos una prueba suplementaria, bioquímica o enzimática.

Si un aislamiento presuntivo presenta características inusuales a las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos se debe confirmar la identificación con pruebas bioquímicas y enzimáticas.

Es muy importante contar con vigilancia de laboratorio de la resistencia a los antimicrobianos de *N. gonorrhoeae* por el método de dilución en agar, en función de recomendar tratamientos efectivos locales.

Solo la medición *in vitro* de la susceptibilidad de los microorganismos infectantes puede brindar información objetiva para determinar si un aislamiento posterior al tratamiento presenta una resistencia verdadera al agente antimicrobiano usado para tratar la infección, o por el contrario, si es una infección por falla del tratamiento debido a la absorción inadecuada del antimicrobiano, el incumplimiento en el tratamiento o la reexposición.

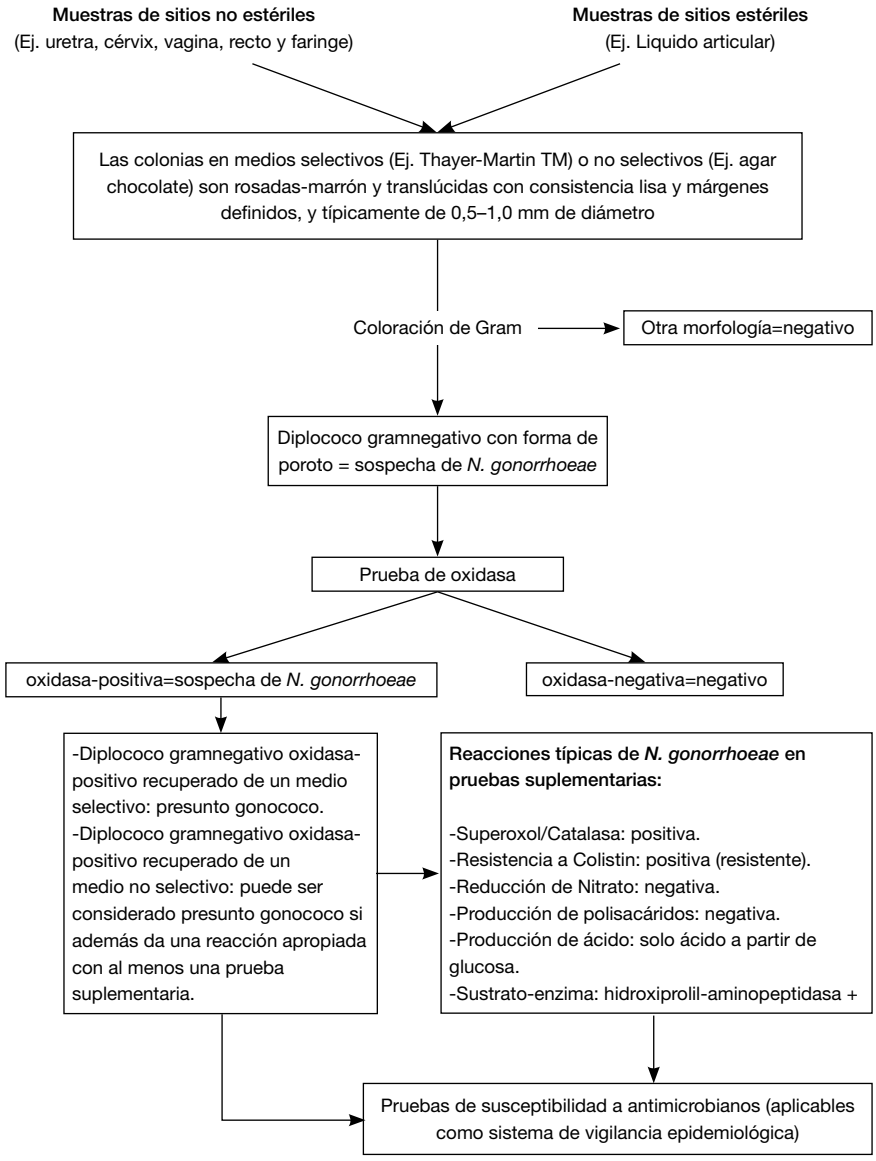
Con respecto a la población, la vigilancia de la susceptibilidad a antimicrobianos es la clave para el monitoreo local, regional o internacional de la resistencia, ayudando a modelar políticas de salud pública

Actualmente, existen pruebas rápidas (inmunoensayos) para investigar *N. gonorrhoeae* en forma directa a partir de muestras obtenidas de uretra o endocérvix, permitiendo detectar antígenos gonocócicos, sin el requerimiento de la viabilidad bacteriana. Estos ensayos rápidos no son útiles para muestras obtenidas de faringe debido a que no alcanzan la capacidad de detección, ni de recto por la gran cantidad de falsos positivos que se presentan.

En el caso de *N. gonorrhoeae*, el estudio serológico de anticuerpos como método diagnóstico carece de valor.

La inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales, ya sea usando el material clínico o bien la cepa obtenida de cultivo fresco, tiene una utilidad de confirmación complementaria a las de identificación convencional. Esta técnica está recomendada en la búsqueda de *N. gonorrhoeae* con fines epidemiológicos o examen pasivo por su rapidez, aunque tiene menor sensibilidad.

Diagrama de flujo de las pruebas para aislamiento e identificación presuntiva de cepas de *N. gonorrhoeae*



(Adaptado de Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo- OMS-CDC-2003)

Los métodos más sensibles son los métodos moleculares (reacción en cadena de la ligasa, reacción en cadena de la polimerasa o PCR, y la amplificación mediada por transcripción). La especificidad de estas técnicas depende de los cebadores que se utilicen ya que si se emplean cebadores no específicos, que pueden amplificar blancos presentes en neisserias comensales y también por el intercambio genético entre especies de *Neisseria*, podrían generar resultados falsos positivos en muestras donde, por ejemplo, exista una población bacteriana habitual.

Muchos autores consideran los resultados de estas pruebas como presuntivos de infección. Otras desventajas son su alto costo, su elevado requerimiento de controles de calidad, no aportan datos de la resistencia a antimicrobianos además de ser necesaria la confirmación por cultivo en zonas de baja prevalencia.

Diagnóstico de micoplasmas

Los denominados micoplasmas genitales (por su localización en el tracto urogenital) incluye las especies: *M. hominis*, *Ureaplasma* spp. (con dos biovariedades: *U. parvum* y *U. urealyticum* y que se clasifican en un género aparte por poseer actividad ureasa) y *M. genitalium*. Otras especies que también se localizan en el tracto urogenital son *M. penetrans*, *M. spermatophilum* y *M. fermentans*.

Entre estos, *M. genitalium, M. hominis* (Mh) y *U. urealyticum* (Uu), producen infecciones urinarias y genitales. Otros micoplasmas, no considerados patógenos como *M. fermentans* y *M. penetrans,* han sido relacionados con un posible incremento de la actividad replicativa del VIH.

M. hominis y *Ureaplasma* spp. tienen una prevalencia elevada en la colonización del tracto genital de individuos asintomáticos sexualmente activos (tasas de colonización de 5-20%). Por esta razón es difícil valorar en cada situación su papel como patógenos.

Su aislamiento en cualquier cantidad de un líquido o tejido normalmente estéril, está significativamente asociado a enfermedad. Sin embargo, cuando la muestra se obtiene a través de o procede del tracto genital normalmente colonizado, el diagnóstico microbiológico debe basarse en la cuantificación de los aislamientos a fin de diferenciar entre colonización e infección.

Para el diagnóstico de micoplasmas genitales, la muestra a tomar debe ser de acuerdo a la patología que se sospeche:

Sospecha clínica	**Muestra**
Uretritis no gonocócica (UNG)	Secreción uretral y/o 1er.chorro miccional
Prostatitis	Secreción prostática
Fiebre post-parto y/o aborto	Hemocultivos, endocérvix y/o endometrio
Pielonefritis. Síndrome uretral	Orina por punción suprapúbica
Infertilidad masculina	1er chorro y esperma
Infertilidad femenina	Endocérvix y/o endometrio. Líquido peritoneal
Abortos a repetición	Endocérvix. Fruto del aborto.
Enfermedad inflamatoria pélvica (EIP)	Material tomado por aspiración a través de catéter protegido por laparoscopía o culdocentésis

Los micoplasmas carecen de pared celular, por lo que no se pueden colorear ni observarse al fresco. La coloración de naranja de acridina (observación con microscopio de inmunoflurescencia) solo es útil para detectar micoplasmas en hemocultivos.

El cultivo es imprescindible pudiendo utilizarse medios selectivos líquidos (como el U9) y medios sólidos diferenciales (como el medio A7 de Shepard) donde se aprovechan las propiedades metabólicas (capacidad de hidrolizar glucosa o arginina o urea) de las distintas especies de micoplasmas. Estos medios, disponibles en el mercado, poseen además, suero (bovino fetal, de caballo), suplementos de aminoácidos, antibióticos (para inhibir la contaminación acompañante), y rojo fenol como indicador del pH.

Las muestras deben homogeneizarse antes de la siembra y para neutralizar la posible presencia de antimicrobianos, anticuerpos u otros inhibidores es muy importante que previamente se diluyan, lo que ocurre al utilizar un medio de transporte líquido.

Dado que es necesaria la cuantificación de la carga de micoplasmas presentes, es obligatorio realizar diluciones seriadas de la muestra, las que se inocularan en el medio de cultivo líquido y sólido.

Los caldos inoculados se incuban en atmósfera aerobia y las placas en atmósfera con 5-10% de CO_2, ambos a 35ºC. Los caldos se observan durante 4 días y las placas 7 días, antes de descartarlos como negativos.

Las técnicas en medio líquido se basan en la capacidad de Uu y Mh de metabolizar respectivamente la urea y la arginina. El crecimiento de los microorganismos se visualiza por el viraje de un indicador coloreado- el rojo fenol- del amarillo-anaranjado al rojo que traduce la alcalinización del medio debido a la liberación de amoníaco.

La identificación puede realizarse en forma presuntiva por la morfología de las colonias que desarrollan en las placas de agar y la identificación definitiva según su comportamiento al hidrolizar urea, arginina y glucosa o mediante PCR.

Las colonias de *Ureaplasma* spp. en agar A7, por ejemplo, presentan un aspecto característico de "erizo de mar" y son de color marrón oscuro por la precipitación de las sales de manganeso presentes en el medio de cultivo. Las colonias de *M. hominis* presentan un aspecto característico de "huevo frito".

En el mercado existen equipos comerciales que consisten en galerías con pocillos que permiten la numeración (recuento) e identificación de *U. urealyticum* y de *M. hominis* a partir de muestras endocervicales, uretrales, urinarias, gástricas y en esperma, permitiendo en algunos sistemas, la detección de la resistencia a ciertos antimicrobianos ya que contienen antimicrobianos liofilizados en concentraciones que corresponden a los puntos de corte propuestos para definir al aislamiento como sensible, intermedio o resistente. (Figura 4).

Figura 4. Equipo comercial para el recuento e identificación de micoplasmas. Imagen superior: ensayo con resultados positivos. Imagen inferior: ensayo con resultados negativos. Filas: 1 a 3: recuento de *U. urealyticum*, 4 a 6: identificación de *U. urealitycum* y *M. hominis*, 7: recuento de *M. hominis*, 8 a 10: susceptibilidad a levofloxacina, 11 y 12: susceptibilidad a moxifloxacina, 13 y 14: susceptibilidad a eritromicina, 15 y 16; susceptibilidad a clindamicina, 17 a 20: susceptibilidad a tetraciclina.

En general, cualquiera sea el método utilizado (cultivo convencional o equipos comerciales), los recuentos iguales o superiores a 10^4 UCC (Unidades Cambiadoras de Color) o de UFC (Unidades Formadoras de Colonias)/ml en secreción uretral o de 10^3 UCC o UFC/ml en el primer chorro de orina, se consideran significativos.

En muestras vaginales, los recuentos elevados (iguales o superiores a 10^5 UCC o UFC/ml) suelen asociarse a vaginosis bacteriana. También, existe una asociación altamente significativa de *Ureaplasma* spp., con parto pretérmino y endometritis, cuando se obtienen en muestras vaginales recuentos > 10^4 UCC o UFC /ml, o de *M. hominis* iguales o superiores a 10^4 UCC o UFC/ml.

Recordar que los micoplasmas pueden estar presentes como microbiota transitoria de la mujer o ser parte de la población bacteriana normal, siendo controvertida su participación en infecciones del tracto genital inferior, a pesar de ello debería tenerse en cuenta el tratamiento (ante una recuperación positiva) cuando:

1. la pareja tenga uretritis comprobada por *U. urealyticum* (sea o no sintomática)
2. es sintomática y se aisle *U. urealyticum* como único responsable probable de la cervicitis
3. tenga respuesta inflamatoria cervical positiva sin otra causa que la justifique (especialmente *C. trachomatis*)
4. tenga antecedentes de abortos espontáneos, nacimiento de niños de bajo peso o con síndrome de "distress" respiratorio (en estos casos la respuesta inflamatoria no se tiene en cuenta)
5. sea sintomática, tenga leucocituria y se recupere *U. urealyticum* de uretra como único responsable de un síndrome uretral femenino.
6. sea portadora del VIH (en estos casos la respuesta inflamatoria no debería tenerse en cuenta)

La serología no es útil para el diagnóstico de micoplasmas genitales, ya que la facultad de estos microorganismos de colonizar habitualmente las mucosas del tracto urogenital dificulta la interpretación de los títulos de anticuerpos y su mera presencia no se considera significativa.

Para el diagnóstico de infecciones causadas por micoplasmas en neonatos, ver el **Capitulo 8. Infecciones perinatológicas.**

Diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*

Para el diagnóstico de *C. trachomatis,* nunca será reiterativo recalcar la importancia que tiene la correcta toma de muestra. Es esencial remarcar el concepto de que la muestra deberá contener material celular más que fluidos corporales.

Dada la cantidad de patologías atribuibles a este microorganismo (conjuntivitis, uretritis, epididimitis, cervicitis, endometritis, salpingitis, neumonía del recién nacido, etcétera), a continuación se detallan o reiteran los posibles sitios de recuperación y la manera de obtener el espécimen.

Uretra	Raspado endouretral
Cérvix	Raspado endocervical
Ojos	Hisopado
Epidídimo	Aspiración
Trompas de Falopio	Hisopado o biopsia
Tracto respiratorio	Hisopado naso-faríngeo Aspiración o biopsia
Nódulo linfático	Aspiración
Oído medio	Aspiración

En el sexo masculino la infección por *C. trachomatis* es una de las patologías sexualmente transmisibles más difundida, pudiendo participar como único agente o ser concomitante con otros patógenos, particularmente *N. gonorrhoeae*.

Hasta principios de los años 80, el principal método de diagnóstico de infección por clamidias fue el cultivo celular. Luego, aparecieron ensayos de inmunofluorescencia usando anticuerpos monoclonales, técnicas de enzimoinmunoensayo (ELISA), técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y de amplificación de ácidos nucleicos (PCR).

El cultivo se realiza sobre células HeLa, McCoy o BHK (técnica excelente pero que requiere de experiencia, un laboratorio de cultivo celular y personal altamente entrenado), con una especificidad del 100% y una sensibilidad entre el 70 a 85%, por lo que ha quedado relegado a laboratorios de referencia y para estudios epidemiológicos y/o forenses.

Una ventaja inherente, es que el cultivo permite detectar bacterias vivas así como realizar estudios de resistencia a antimicrobianos aunque, al ser *Chlamydia* una bacteria muy lábil, se debe ser muy riguroso en las condiciones de transporte y conservación de la muestra, manteniendo la cadena de frío. El éxito y la sensibilidad del cultivo celular depende de la correcta toma de muestra, tipo de hisopo usado, tiempo de transporte al laboratorio y la conservación a -70ª C, hasta su procesamiento.

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, dada su elevada sensibilidad y especificidad se consideran actualmente, las técnicas de referencia para el diagnóstico de las infecciones por *C. trachomatis*. Estas técnicas, en casi todos los casos se basan en PCR en tiempo real (qPCR) y permiten el diagnóstico en muestras oculares, cervicales, uretrales, semen y orina. Dada su exquisita sensibilidad deben ser realizadas muy cuidadosamente para evitar falsos positivos.

También se puede realizar el diagnóstico a partir de extendidos de materiales clínicos (genitales y extragenitales) por inmunofluorescencia directa (IFD) con anticuerpos monoclonales, contra el lipopolisacarido (LPS), contra la Proteína Mayor de la Membrana Externa (MOMP) de mayor especificidad o contra la proteína de choque de calor HSP90.

La IFD es una técnica rápida de diagnóstico pero la observación microscópica es demandante, requiere personal entrenado para la visualización de la coloración y morfología característica de las inclusiones clamidiales y tiene baja reproducibilidad, por ello no es adecuada para el procesamiento de un gran número de muestras clínicas. Su fortaleza radica en que permite evaluar la calidad de la muestra (una muestra inadecuada contendrá un exceso de mucus o un predominio de células escamosas vaginales estando ausentes las células epiteliales columnares) además de no requerir condiciones estrictas para su transporte.

La sensibilidad de la IFD, varía según el tipo de población estudiada: es elevada en poblaciones con alta prevalencia de infección por clamidias y en población sintomática, y se reduce notablemente en poblaciones con baja prevalencia de infección y en personas asintomáticas.

Actualmente, el ELISA es una técnica de gran difusión por ser accesible a laboratorios sin acceso a cultivos celulares o técnicas moleculares, e involucra la extracción de un antígeno lipopolisacárido (regiones epitopo-específicas del LPS) de las especies de clamidias (que es más soluble que la MOMP) y su detección colorimétrica al reaccionar con el anticuerpo. Sin embargo, su especificidad es baja pudiendo dar falsos positivos por la presencia de otros LPS bacterianos, en especial si la carga bacteriana es elevada, por ello no puede emplearse en muestras rectales ni faríngeas, ni en poblaciones de baja prevalencia.

Para el diagnóstico de infección faríngea y de proctitis asociada a *Chlamydias*, solo están indicadas las técnicas de cultivo celular o de IFD con anticuerpos monoclonales (AcMo- anti MOMP).

El ELISA, comercialmente disponible, está preformado para ser usado en muestras uretrales, endocervicales, orina masculina y muestras oftálmicas.

Existen además, pruebas rápidas denominadas *point-of care* (punto de atención en su traducción al idioma español) que emplean la tecnología de ELISA en un formato que se basa primariamente en captura de membrana o inmunodifusión con látex. Estos ensayos, si bien podrían ser útiles en regiones con recursos limitados o como tamizaje (*screening*), han demostrado muy baja sensibilidad y especificidad, aún en poblaciones con alta pre-

valencia, por lo que gran parte de los trabajos publicados desaconsejan su uso. De utilizarse, no deberían implementarse en zonas de baja prevalencia ni en personas asintomáticas debido a los falsos positivos, además los resultados obtenidos deberían ser considerados como presuntivos y de ser positivos, deberían confirmarse por otra técnica.

El diagnóstico serológico es posible. Las técnicas a utilizar permiten detectar anticuerpos género-específicos (Fijación de complemento, Inmunofluorescencia indirecta, ELISA), anticuerpos especie-específicos (ELISA) o anticuerpos tipo-específicos (Microinmunofluorescencia). Sin embargo, son poco útiles para el diagnóstico de infecciones oculares o genitales causadas por *C. trachomatis* ya que un resultado positivo no distingue entre infección pasada o actual. Además, en la población sana hay alta prevalencia de IgG anti-clamidia. La detección de IgM, sí es útil en el recién nacido.

Como ha sido mencionado, *C. trachomatis* está asociada a infecciones oculares tanto en el adulto como en el recién nacido denominadas: tracoma u oftalmia egipcia (estadio avanzado de la conjuntivitis folicular) y producida por los serotipos A, B, Ba y C, conjuntivitis de inclusión neonatal (producto de la infección materna) y conjuntivitis de inclusión en el adulto (manifestación ocular de la ITS por clamidias), también denominada conjuntivitis folicular.

Para el diagnóstico de tracoma y de conjuntivitis de inclusión en el adulto, se utilizan los métodos descriptos previamente para infecciones genitales (cultivo celular, IFD, ELISA, técnicas moleculares).

Para el diagnóstico de conjuntivitis neonatal, además de los ya mencionados se puede utilizar la citología. La observación en un frotis del material obtenido por raspado del epitelio conjuntival y teñido con Giemsa de inclusiones basófilas citoplasmáticas, es patognomónico de la infección. La tinción de Giemsa, si se estudia todo el frotis y la observación la realiza personal entrenado tiene alta especificidad.

Otra tinción que se ha utilizado es la de Lugol, pero tiene muy baja especificidad ya que el glucógeno no está presente en todo el ciclo de *Chlamydia*. Tampoco, es útil en el diagnóstico de muestras genitales femeninas por la presencia del glucógeno almacenado en las células de la pared vaginal.

A excepción de la conjuntivitis de inclusión neonatal, ninguno de los métodos citológicos donde se utilizan tinciones puede ser utilizado en otras muestras clínicas dada su baja sensibilidad y especificidad.

Diagnóstico de úlceras genitales

Sífilis: Los métodos utilizadas para su diagnóstico se tratan en el **Capítulo 8**, junto a sus características, factores de virulencia, camino al daño, clínica y tratamiento.

Chancro blando: En los últimos años ha aumentado el interés en esta infección aguda producida por *Haemophilus ducreyi*, por ser el chancro característico (doloroso, de sangrado fácil, que asienta sobre la piel genital: prepucio, frenillo, horquilla vulvar o labios mayores) una importante puerta de entrada del virus VIH. En ambos sexos, si practican sexo anal, es frecuente la presencia de ulceras perianales. En la mitad de los pacientes, se observa adenitis inguinal unilateral que puede derivar en la formación de bubones.

Para la toma de muestra se debe eliminar de la lesión toda secreción hasta llegar al lecho de la úlcera y hacerlo sangrar. El material se toma con ansa debajo de los bordes.

Como es característica la formación de bubón por la importante adenopatía inguinal que se produce, se puede intentar el aislamiento del germen a partir del pus que se obtiene al punzarlo.

El procesamiento debe ser inmediato por la labilidad del microorganismo y por la gran cantidad de población microbiana que puede estar asociada. De ser inevitable, se recomienda el medio de Amies por no más de 24 hs ó utilizar como transporte 2-3 ml de sangre de caballo o humana coagulada.

La coloración de Gram (típicamente pequeños bacilos o cocobacilos gram negativos o gram variable delgados y pleomórficos, con disposición en cadena o en "banco de pescado") es difícil de interpretar y tiene muy baja sensibilidad y especificidad, debido a la población microbiana que puede estar asociada.

El diagnóstico puede realizarse por cultivo, aunque su sensibilidad no supera el 80%

Al ser una bacteria exigente es necesario utilizar medios muy enriquecidos. La incubación se debe realizar durante al menos 72 hs a 35ºC y en atmósfera húmeda con 5% de CO_2.

Los medios base recomendados son el agar GC, agar Columbia o agar Mueller Hinton, enriquecidos con 1-2% de hemoglobina bovina, 5% de suero bovino fetal o 0,2% de carbón activado, se calientan hasta 80 ºC a fin de obtener agar chocolate, luego se dejan enfriar hasta 40-50ºC y se agrega 1% de Isovitalex. Es conveniente agregar al medio (junto al Isovitalex)

vancomicina en concentración de 3 mg/L para inhibir el desarrollo de cocos grampositivos.

Las colonias de *H. ducreyi* son pequeñas, grises, a veces con una pequeña zona de alfa-hemólisis y con la características de deslizarse al tratar de levantarlas con el ansa.

La técnica de diagnóstico actualmente indicada es la PCR, que presenta una sensibilidad del 95% en comparación con el cultivo. Debido a la dificultad de acceso a estas técnicas en muchos laboratorios, se han desarrollado técnicas inmunocromatográficas de menor sensibilidad.

La serología, puede ser útil con fines epidemiológicos pero no es útil para el manejo directo de los pacientes.

Linfogranuloma venéreo (LGV): Esta patología causada por *C. trachomatis*, serotipos L1, L2, L3, se caracteriza por la formación de un chancro con localización genital o rectal.

El chancro es pequeño, poco profundo e indoloro, por lo que al ser asintomático en general pasa inadvertido. Un segundo estadío de la enfermedad está caracterizado por una linfadenopatía regional supurativa dolorosa (bubón) que pueden perforarse permitiendo la salida de un pus espeso.

La mejor muestra es la obtenida de la punción aspiración del ganglio, preferiblemente antes de que se forme la fístula a fin de evitar la sobreinfección.

El diagnóstico se efectúa por las técnicas habituales de diagnóstico de *C. trachomatis*, ya descriptas.

También pueden utilizarse técnicas serológicas como:

- Reacción de fijación de complemento: es de utilidad de existir seroconversión o un título alto (>1/256). Puede haber reacción cruzada con *C. psittaci.*
- Microinmunofluorescencia: es un método más sensible y específico para medir anticuerpos anti-LGV, los títulos altos (>1/128) confirman el diagnóstico.

Bibliografía consultada

Acosta, Boga B. y col.: "Diagnóstico microbiológico de las infecciones por Mycoplasma spp. y Ureaplasma spp. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Procedimientos en Microbiología Clínica 40". 2011. Disponible en: http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia40.pdf.

Alonso R y col. "Diagnóstico microbiológico de las infecciones por Chlamydia spp. y especies relacionadas. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Procedimientos en Microbiología Clínica 44". 2012. Disponible en: http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia44.pdf.

Aznar Martín J. y col. "Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Procedimientos en Microbiología Clínica 24". 2007. Disponible en: http://www.seimc. org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia24.pdf

Bouza, E (coordinador): "Procedimientos clínicos VIII: Enfermedades de transmisión sexual". Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2007. Disponible en: http://www.seimc. org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosclinicos/seimc-procedimientoclinicoviii.pdf

Caballero Rendon J.: "Actualización en farmacología clínica: MACROLIDOS". *Rev Paceña Med Fam.* 2007; 4(6): 149-153

Cancelo, Hidalgo MJ; Cancelo, Hidalgo C.; Chavida García, E. : Vaginitis por *Trichomonas*. SEMERGEN 31(3): 121-124. 2005.

Cecchini, E (Ed): *Infectología y enfermedades infecciosas*. Ediciones Journal. 2007.

Federación Argentina de Sociedades de Ginecología y Obstetricia, Fundación Bioquímica Argentina, Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad de Buenos Aires, y col.: "Guía práctica integral (Clínica-Laboratorio) de diagnóstico de vaginosis-vaginitis en la atención primaria de la mujer en edad fértil y menopausia".

Actualización 2012. Disponible en: http://www.fba.org. ar/ programas/prosar/GUIA_PRACTICA_INTEGRAL_2012.pdf.

Figueroa-Damián R: "*Uretritis gonocócica"*. *Perinatol Reprod Hum 2013*; 27 (2): 113-122.

Fosch SE; Yones C; Trossero M; Grosso O: "Influencia del método anticonceptivo en el perfil de la función vaginal en un microambiente social". Acta Bioquím. Clín. Latinoam, 2011; 45 (4): 763-772.

Fuchs W, Brockmeyer NH. Sexually transmitted infections. *J Dtsch Dermatol Ges* 2014; 12(6): 451-463.

Lepe Jiménez, JA; Otero Guerra, L; Blanco Galán, MA; Aznar Martín, J; Vázquez Valdés, F: "Panorama actual de la epidemiología, diagnóstico y tratamiento de las infecciones de transmisión sexual". *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008; 26 (Suppl 13): 25-31.

Lewis, DA. : Chancroid: clinical manifestations, diagnosis, and management. *Sex Transm Infect.* 2003; 79(1): 68-71.

Ljubin-Sternak S; Meštrović, T: "Chlamydia trachomatis and genital Mycoplasmas: pathogens with an impact on human reproductive health". *J Pathog* 2014; 2014: 183167.

Llorente MolinaI, D; Mauriz GuerraI, ML; Cedeño LlorenteII, S: "Importancia clínica de las *Chlamydias"*. *Rev Cubana Med Gen Integr*. 2013; 29(2): 214-225.

Malhotra, M. ; Sood, S. ; Mukherjee, A. ; Muralidhar, S. ; Bala, M. : Genital *Chlamydia trachomatis*: an update. *Indian J Med* Res 2013; 138(3): 303-316.

Maritato, A (coordinadora) y col.: *Manual de procedimiento BACOVA 2012*. Fundación Bioquímica Argentina. Programa de Salud Sexual y Reproductiva (PROSAR). 2012. Disponible en: http://www.aba-online.org.ar/2012%20Manual%20Procedimiento%20BACOVA.pdf

Martínez T MA: Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual (ITS). Parte 1. ITS no virales. *Rev Chil Infect*. 2009; 26 (6): 529-539.

Oviedo, P; Quiroga, M; Laczeski, M; Pegels, E; Marino, D; Arce, L; Vergara, M: Frecuencia de vaginosis bacteriana en embarazadas. VI Jornadas Científico Tecnológicas de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones. 12-13- 14- de noviembre de 2007.

Puerta-Suárez J; Giraldo M; Cadavid AP; Cardona-Maya W: "Infecciones bacterianas del tracto reproductivo masculino y su papel en la fertilidad". *Rev Chil Obstet Ginecol.* 2014; 79(3): 209 – 217.

Roett, MA; Mayor, MT; Uduhiri, KA. : Diagnosis and management of genital ulcers. *Am Fam Physician* 2012; 85(3): 254-262.

Rodríguez-Domínguez, M; Sanbonmatsu, S; Salinas, J; Alonso, R; Gutiérrez, J; Galán, JC. : Diagnóstico microbiológico de las infecciones por Chlamydia spp. y especies relacionadas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014; 32(6): 380-385.

SADI Primer Consenso de Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de las Enfermedades. Septiembre de 2011

Santoianni J; Terradas C; Smayevsky J; Nagelberg A; Farinati A; Mormandi E; Predari S: 1° Consenso Argentino sobre diagnóstico de las infecciones de las vías espermáticas y glándulas anexas en infertilidad. *Rev Bioq Patol Clin*. 2002; 66(1): 9-27.

Spence D, Melville C. Vaginal discharge. *BMJ.* 2007; 335(7630): 1147-1151.

Update to CDC's Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010: Oral Cephalosporins No Longer a Recommended Treatment for Gonococcal Infections Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). August 10, 2012 / 61(31); 590-594.

Vázquez F; Otero L; Ordás J; Junquera M L; Varela J A. : "Actualización en infecciones de transmisión sexual: epidemiología, diagnóstico y tratamiento". *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 22(7): 392-411. 2004.

Vázquez-Maya L; Ramírez-Villagrán B; Vázquez-Campuzano R; Villavicencio-Torres A: Prevalencia de Chlamydia trachomatis en adultos con conjuntivitis folicular crónica. *Rev Med Hosp Gen Mex.* 2009; 72(2): 73-77.

Vergara Marta y cols.: *Las Infecciones Bacterianas y el Laboratorio de Bacteriología*. Posadas. EdUNaM. 2009. 141-5.

Viscarra, T; Brebi, P; Andana, A; Sánchez, R.: "Infecciones de transmisión sexual en semen. El hombre como vector de transmisión". *Int J Morphol*. 2013; 31(1): 254-263.

Oviedo, P; Quiroga, M; Laczeski, M; Pegels, E; Marino, D; Arce, L; Vergara, M. : Frecuencia de vaginosis bacteriana en embarazadas. VI Jornadas Científico Tecnológicas de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones. 12-13- 14 de noviembre de 2007.

SADI Primer Consenso de Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de las Enfermedades. Septiembre de 2011.

CAPÍTULO 4
Infecciones: Vías Respiratorias (IVR)

Las bacterias y la virulencia ■ marta vergara

Diversos microorganismos colonizan el tracto respiratorio superior.

Algunos patógenos como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisserias* spp. y otros como *Staphylococcus epidermidis* y corinebacterias son los habitantes frecuentes de la nariz, colonizándola siempre.

También *Staphylococcus aureus* coloniza la nariz, la que se convierte en un importante reservorio de este microorganismo y actualmente de gran utilidad para la búsqueda de *Staphylococcus aureus* con resistencia a la meticilina en la comunidad (SAMR-CA) (**Capítulo 5**).

Los senos paranasales sanos son estériles. También el tracto respiratorio bajo (tráquea, bronquios y pulmones) está virtualmente libre de microorganismos, debido fundamentalmente a la acción de limpieza del epitelio ciliar.

Si una bacteria alcanza el tracto respiratorio inferior puede ser arrastrada hacia arriba mediante la acción ciliar de los bronquios y removida luego por el estornudo, la tos o la deglución.

Cuando el epitelio del tracto respiratorio se daña, como ocurre en la bronquitis o en la neumonía viral, el huésped queda susceptible a la infección por patógenos bacterianos, como *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, que descienden desde la nasofaringe para iniciar el daño.

Faringitis estreptocóccica

Streptococcus pyogenes- grupo A

Streptococcus ß-hemolítico grupo A (SGA) es una bacteria perteneciente a un grupo heterogéneo de microorganismos de importancia clínica.

Taxonómicamente, según la 9ª Edición del Manual de Determinaciones Bacteriológicas de Bergey, está ubicado en:

Grupo 17: Cocos Gram Positivos
Género:
Streptococcus
Enterococcus
Abiotrophia
Pediococcus
Gemella
Lactococcus
Vagococcus
Aerococcus

El descubrimiento de *Streptococcus pyogenes* data de1874, cuando Billroth lo describe en casos de erisipela y de infecciones de heridas, tanto cutáneas y sistémicas.

Es Pasteur en 1879, quien lo aísla de la sangre de una paciente con sepsis puerperal.

Hacia 1884, Rosenbach se refiere a este microorganismo como *Streptococcus. pyogenes.* Recién en 1933, R Lancefield los agrupa en la categoría A de su clasificación como *Streptococcus pyogenes* grupo A (SGA). Las infecciones producidas por SGA son las enfermedades infecciosas más frecuentes. En general, suelen presentarse en niños, con una frecuencia máxima entre los 4 y los 7 años. La morfología de este microorganismo responde a cocos grampositivos agrupados en pares o cadenas. Son cocos grampositivos de 0.5 a 2 µm de diámetro.

Se desarrollan en medios nutricionalmente ricos pero con una baja tensión de oxígeno y en un rango de temperaturas que varía entre 25-45°C. No forman esporas, son capsulados y obtienen su energía a través del metabolismo fermentativo, productor de lactato pero no de gas.

Los grupos A, B, C, y G son los que más frecuentemente se asocian a infecciones humanas y en especial el grupo A.

SGA es uno de los patógenos bacterianos más importantes de los seres humanos y las infecciones producidas por SGA son las enfermedades infecciosas más frecuentes.

SGA coloniza habitualmente la orofaringe de los niños y adultos jóvenes. Ha sido reportada una incidencia de portadores entre 15 y 20%. El encuentro inicial de SGA con las superficies de los epitelios del huésped ocurre en la faringe o la piel. Siempre fue considerado un patógeno extracelular.

Como constituyente de la población microbiana normal, SGA puede causar infección cuando las defensas del huésped están comprometidas. SGA es el responsable de la causa bacteriana más frecuente de faringitis aguda y también de infecciones cutáneas y sistémicas. Estas infecciones se presentan como faringitis, escarlatina, impétigo, celulitis, fascitis y otras.

Desde numerosas propiedades que le facilitan la adhesión a las células del huésped para la colonización, (**Capítulo 1**) la resistencia a los mecanismos de limpieza natural de microorganismos de las mucosas, hasta numerosos factores de virulencia asociados a la invasión, al daño y la variación inmunológica, convierten a estas bacterias en una constante preocupación en salud.

Generalmente, la enfermedad por este agente suele estar causada por cepas adquiridas recientemente, capaces de establecer una infección en la orofaringe o la piel, en forma invasiva, antes de que se produzcan anticuerpos específicos o de que los microorganismos competitivos puedan proliferar. En nuestro país las enfermedades invasivas por SGA son de notificación obligatoria.

Como en otras bacterias, la expresión de los genes asociados a los diversos factores de virulencia, está modulada por sensores ambientales, (**Capítulo 1**) que le posibilitan a la bacteria conocer el lugar donde se encuentra para la elaboración de los mismos, a fin de invadir y diseminarse.

Proteínas de unión a la fibronectina han sido implicadas en la adhesión a las células epiteliales del tracto respiratorio alto y la proteína M en la adhesión a las células de la piel.

Esta capacidad de unirse a la matriz proteica extracelular y de producir un amplio rango de moléculas tóxicas, le confieren un gran poder de virulencia. Siempre fue considerado un patógeno extracelular.

SGA puede producir diferentes tipos de adhesinas y o invasinas que reconocen diferentes blancos en los tejidos del huésped.

SGA es el prototipo de bacterias que mayor diversidad y número de factores de virulencia produce: son numerosas las moléculas involucradas

en los procesos de estudio de SGA, como sus mecanismos para agredir al huésped.

> Sustancia T

La sustancia T: Este antígeno no tiene interrelación con la virulencia de los estreptococos. A diferencia de la proteína M, la sustancia T es acidolábil y termolábil. Se obtiene mediante la digestión proteolítica que destruye con rapidez a la proteína M. La sustancia T permite diferenciar ciertos tipos de estreptococos por aglutinación con antisueros específicos en tanto que otros tipos comparten la misma sustancia T.

> Nucleoproteínas

La extracción de los estreptococos con una base débil produce mezclas de proteínas y otras sustancias con escasa especificidad serológica cuyo mecanismo aún no se encuentra del todo dilucidado.

> Toxinas y enzimas

Los estreptococos del grupo A fabrican más de 20 productos extracelulares antigénicos, los cuales incluyen:

> Estreptodornasa

La estreptodornasa o desoxirribonucleasa estreptocócica, despolimeriza el DNA. La disminución de la viscosidad de las soluciones de DNA con viscosidad conocida y cuantificada se puede medir con esta sustancia. Los exudados purulentos deben su viscosidad principalmente a la desoxirribonucleoproteína. Licuan los exudados y la pus y tejido necrosado pudiendo así separarse. Por este mecanismo los antimicrobianos tienen mejor acceso y las superficies infectadas se recuperan con mayor rapidez. Se desarrolla un anticuerpo DNasa, en especial después de las infecciones de la piel.

> Hialuronidasa

La hialuronidasa desdobla el ácido hialurónico, un componente importante de la sustancia fundamental del tejido conectivo que colabora como un factor de propagación de los microorganismos. Las hialuronidasas son antigénicas y específicas de cada bacteria o fuente tisular, generando anticuerpos específicos.

> Exotoxinas pirógenas

Cuando SGA ha penetrado en los tejidos profundos del huésped, desarrolla diversas infecciones de variada severidad. La elaboración de las toxinas pirógenas, implicadas en los procesos infecciosos invasivos más severos, llamadas toxinas eritrogénicas tipo A, B y C estreptocócicas son antigénicamente distintas. Las producen los estreptococos del grupo A que portan un fago lisogénico. Constituyen una familia de superantígenos bacterianos que, junto a la proteína M, son los principales factores de virulencia asociados a las infecciones invasivas mencionadas. (**Capítulo 5**). El síndrome de shock tóxico y la fascitis necrotizante dan cuenta de ello.

Meningitis y endocarditis, también se cuentan entre las enfermedades severas ocasionadas por SGA.

La mayoría de las cepas de estreptococos del grupo A aisladas de los pacientes con síndrome de shock tóxico estreptocócico producen exotoxina A, ya que poseen el gen que la codifica.

La exotoxina pirógena estreptocócica C también puede contribuir al síndrome, en tanto que la función de la exotoxina pirógena estreptocócica B aún no es clara.

> Difosfopiridina nucleotidasa

No todos los estreptococos producen esta enzima. Esta sustancia puede vincularse con la capacidad de los organismos para destruir leucocitos.

> Hemolisinas

La hemólisis β que causa la lisis completa de los eritrocitos y la lisis incompleta o hemolisis α, con formación de pigmento verde en las placas de agar sangre son responsabilidad de estas hemolisinas.

SGA elabora dos hemolisinas o estreptolisinas: La estreptolisina O y S, que revisamos más adelante.

El camino al Daño

> Para la adherencia o colonización

- proteína M
- proteína F
- ácido lipoteicoico (ALT).

La proteína M es la principal proteína de superficie y el principal factor de virulencia de los SGA.

La proteína M es un factor de virulencia importante para SGA. Aparece como prolongaciones semejantes a pelos de la pared celular del estreptococo, y se proyecta como un dímero, espiralado- enrollado- helicoidal que semejan fibrillas sobre la superficie de la bacteria. Estas proteínas se identifican como pertenecientes a clase I y clase II, según tengan un epitopò expuesto en la superficie que reacciona con anticuerpos contra el mismo. La clase II no reacciona con dichos anticuerpos al carecer del epitopo superficial. Los tipos de proteínas responsables de enfermedad invasiva y tóxica son M1, 3, 11, 12 y 28. Los serotipos más frecuentes son M1 y M3. Los SGA vinculados con el síndrome de shock tóxico son principalmente de los tipos 1 y 3 de proteína M.

Cuando la proteína M está presente los estreptococos son virulentos y en ausencia de anticuerpos específicos tipo M pueden resistir la fagocitosis mediada por polimorfonucleares. Además posibilita a estas cepas, la capacidad de multiplicarse con rapidez en la sangre y desencadenar la enfermedad. Las cepas que no expresan la proteína M son avirulentas.

La inmunidad contra la proteína protege únicamente contra las reinfecciones con idéntico serotipo, ya que es antigénica, específica de tipo, que provoca anticuerpos protectores contra su tipo.

Debido a que existen más de 80 tipos de proteína M, una persona puede sufrir infecciones repetidas con SGA de diferentes tipos de M.

Es importante destacar aquí que, la proteína M es una molécula anclada en la membrana celular que atraviesa y penetra la pared celular. La porción basal, la más cercana, tiene epitopos conservados de manera generalizada entre los SGA y la porción distal, que sobresale de la superficie celular como una fibrilla, representa la porción específica de tipo (tiene epitopos específicos de tipo).

En el huésped no inmunizado, la proteína M es antifagocitaria, al inhibir la activación de la vía alternativa del complemento sobre la superficie celular. La unión a otras proteínas del huésped, favorece este efecto antifagocitario.

Los SGA se clasifican en serotipos en base a las diferencias antigénicas de las moléculas de la proteína M y en genotipos en base a diferencias en los nucleótidos en el gen *emm* que codifica la molécula. Se conocen en la actualidad más de 120 serotipos y/o genotipos.

La proteína M y proteína F son ejemplos de componentes de superficie del estreptococo que actúan como adhesinas y o invasinas.

Si existen concentraciones adecuadas de anticuerpos específicos de tipo en el huésped, el efecto antifagocitario se anula.

El ácido lipoteicoico es un ligando en la colonización estreptocócica que forma una compleja red con la proteína M y se une por medio de sus fracciones lipídicas a la fibronectina de las células epiteliales.

> Para la diseminación en los tejidos

En general colaboran en la diseminación acciones químicas más que mecánicas.

Los estreptococos elaboran una amplia variedad de hidrolasas extracelulares que le posibilitan romper la barrera de la respuesta inflamatoria del huésped, la que juega un importante rol en la defensa:

- Proteasa, que colabora en la producción de necrosis tisular.
- Estreptoquinasa, que lisa la fibrina, al transformar el plasminógeno del plasma humano en plasmina, enzima que digiere la fibrina y otras proteínas.
- Hialuronidasa.

- Desoxirribonucleasa, que despolimeriza el ADN , reduce la viscosidad del pus que se genera por la liberación de ADN de los leucocitos lisados.
- Otras invasinas y toxinas (muchas antigénicas que colaboran en el serodiagnóstico) como, estrepto-DNasa (leucotóxica), nucleasas que degradan el ácido desoxirribonucleico colaborando en la licuefacción del pus. -esterasas-amilasa-fosfatasa- ATPasa- toxina cardiohepática.

Si bien estos productos son importantes en la patogenia de SGA en las diversas infecciones que produce, los anticuerpos contra ellos, tienen poco o nulo efecto protector en el huésped.

> Para evadir la fagocitosis

- cápsula de ácido hialurónico. Está compuesta por un polímero de ácido hialurónico (codificado por lo genes *has* A, *has* B y *has* C), que contiene unidades repetidas de ácido glucurónico y N- acetilglucosamina. A pesar que la cápsula no es antigénica (el ácido hialurónico es similar químicamente al tejido conectivo del huésped) le permite al microorganismo ocultarse en su propio antígeno y no ser reconocido como antígeno por su propio huésped. La cápsula también evita la fagocitosis por neutrófilos o macrófagos.
- exotoxinas pirógenas, antigénicamente distintas y ya revisamos que son producidas solo por el grupo A y son superantígenos
- proteína M, ya mencionada al interferir con la adherencia entre la célula fagocítica y las bacterias. La cápsula participa también en este proceso.
- la liberación de la C5a peptidasa, proteasa que inactiva el factor C5a (primer factor quimiotáctico en la cascada del complemento) al clivar aminoácidos de su extremo carboxi.
- leucocidinas, hemolisinas, incluyendo las estreptolisinas O y S (mencionadas antes) son proteínas secretadas por SGA que destruyen las membranas de los eritrocitos y otras células- lisan cualquier tipo de células y son tóxicas.

La estreptolisina O (SLO): es una proteína hemolíticamente activa en estado reducido, pero en presencia de oxígeno se inactiva o sea lábil frente al oxígeno. Es parte del crecimiento que ocurre en cortes profundos dentro

del medio de agar sangre en placas. Además de ser tóxica para los eritrocitos, es tóxica para una variedad de células y fracciones celulares, como neutrófilos, plaquetas y otras. Es una hemolisina antigénica elaborada por casi todas las cepas de SGA, como también por muchas cepas de los grupos C y G, involucrada en la cardiotoxicidad y sola, o en combinación con otras toxinas estreptocócicas, se asocia a daño tisular y al síndrome de shock tóxico al incrementar la liberación de citocinas proinflamatorias, entre ellas el FNT **(Capítulo 5).**

Los anticuerpos anti estreptolisina O impiden la hemólisis por la estreptolisina O.

Aún no está claro si cumple alguna función en secuelas no supurativas, como la Fiebre Reumática Aguda (FRA)

La aparición de anticuerpos antiestreptolisina O (ASTO) y su medición, tiene gran utilidad en el diagnóstico de infección estreptocócica reciente.

La estreptolisina S (SLS) también como la O daña las membranas de los PMN, de plaquetas, pero no es antigénica ni es afectada por el oxígeno, de allí que es la responsable de la hemólisis en superficie que se observa en las placas de agar sangre.

La mayoría de las cepas de *Streptococcus pyogenes* producen ambas hemolisinas.

Una vez adheridos, los SGA ricos en proteína M, resisten a la fagocitosis y a la muerte por leucocitos, proliferan y pueden invadir tejidos locales, como faringe o piel y luego los tejidos contiguos diseminándose a puntos distantes a través de la sangre, produciendo infecciones de variada severidad.

Estos microorganismos tienen gran habilidad para colonizar, multiplicarse y diseminarse rápidamente, evadiendo la fagocitosis y la respuesta inmune del huésped.

La faringitis estreptocóccica es adquirida por inhalación de aerosoles emitidos por individuos infectados. Todos los síntomas reflejan la inflamación en el sitio de la infección.

En la infancia, es una de las infecciones bacterianas más frecuentes y es una enfermedad inflamatoria de las mucosas y estructuras vecinas de la faringe.

Si bien son los SGA los responsables de la gran mayoría de los cuadros, están también involucrados a veces los SGC y los SGG.

El contagio es persona a persona por secreciones nasales o gotitas de saliva.

En general, en pacientes no tratados por una enfermedad estreptocócica supurativa, dos severas secuelas pueden aparecer: Glomerulonefritis Aguda (GNA) y (FRA).

Permanece aún incierto el mecanismo exacto de la producción de la FRA. Se han propuestos varias teorías que involucran:

- los efectos tóxicos de los productos estreptocócicos, como las estreptolisinas O y S que producen lesión tisular.
- una reacción de complejos antígeno-anticuerpo, en zonas de la lesión tisular.
- algunos anticuerpos inducidos por ciertas cepas de SGA durante la infección, reaccionan en forma cruzada con ciertos tejidos del huésped, dado la similitud de algunos antígenos estreptocócicos con antígenos titulares humanos.

Estos anticuerpos pueden dañar indirectamente los tejidos, aún tiempo después que los microorganismos fueron eliminados, produciendo severas complicaciones autoinmunes. Se han identificado anticuerpos en el suero de personas con FRA o con cardiopatía reumática, que presentan antigénicamente reacciones cruzadas con el corazón. Llamados también reactivos cardíacos, estos anticuerpos están también en menor cantidad, en personas con faringitis estreptocócica no complicada.

Ciertos tipos de proteína M, sus epitopos, comparten determinantes antigénicos con la miosina cardíaca, entre otras estructuras del huésped.

También está descripta una reacción cruzada entre el polisacárido A y una glucoproteína estructural aislada en las válvulas cardíacas humanas.

Se considera a estas secuelas, como la FRA, no como una consecuencia de la invasión del microorganismo, sino como consecuencia de una respuesta inmunológica anormal al antígeno A del SGA, a su proteína M o a otras estructuras.

Las cepas de SGA más asociadas epidemiológicamente a brotes de FRA son los conocidos como serotipos reumatógenos: tipos 1,3 5, 6, y 18.

De esto se desprende que la vacuna contra la proteína M sería una excelente candidata para la prevención de la infección estreptocócica y la FRA.

Alrededor del 1 a 3% de pacientes desarrollan FRA luego que la infección faríngea ha desaparecido.

La FRA es la secuela de la infección faríngea, y la GNA puede ser secuela de infección faríngea o de piel, causada solo por ciertas cepas de SGA con tropismo por el nefrón, llamadas nefritógenas.

El tipo 12 es el serotipo M que con mayor frecuencia causa GNA tras una faringitis o amigdalitis y el tipo 49 es el serotipo más asociado a la GNA luego de una infección de piel.

También es aún incierto el mecanismo de producción de la GNA. Sí se conoce que la lesión renal tiene una base inmunológica.

Los anticuerpos estimulados por los estreptococos nefritógenos reaccionan con los tejidos renales produciendo lesiones en el glomérulo. Están demostradas semejanzas antigénicas entre componentes estreptocócicos y componentes del riñón humano.

Otras infecciones como la escarlatina y el síndrome de shock tóxico, aparecen como respuestas sistémicas a la circulación de las toxinas bacterianas, (**Capítulo 5**).

SGA frecuentemente se comporta como un invasor secundario a una infección viral o una alteración de la población bacteriana habitual.

En el huésped normal, la piel constituye la primera barrera de defensa contra la invasión por SGA, y mediante los mecanismos inespecíficos de defensa, como los movimientos mucociliares, la tos, y el reflejo epiglótico, la bacteria no penetra más allá del epitelio superficial del tracto respiratorio alto.

La segunda barrera de defensa la constituye el sistema fagocítico, por el que los microorganismos pueden ser opsonizados por la vía clásica o alternativa del complemento y los anticuerpos antiestreptocóccicos del suero.

En las personas inmunes, los anticuerpos IgG contra la proteína M promueven la fagocitosis y la muerte bacteriana.

Como vimos anteriormente, el ácido hialurónico de la superficie celular es un antígeno pobre y no confiere inmunidad protectora, por ser similar químicamente al tejido conectivo del huésped.

Se cree que sólo la infección produce anticuerpos contra la proteína M y las fimbrias, los que sí son protectores. Estos anticuerpos que aparecen post infecciones en piel y tracto respiratorio, son persistentes.

Niveles protectores de IgA son producidos en las secreciones del tracto respiratorio, mientras que niveles protectores de IgG son producidos en el suero.

De hecho que los tratamientos con antimicrobianos evitan el desarrollo de anticuerpos persistentes.

Neumonía Aguda

el camino al Daño

Revisaremos los mecanismos de defensa del pulmón ante la constante exposición a patógenos del medio.

Las cilias, la tos, el mucus que se produce impiden la llegada al pulmón de las grandes partículas.

La primera línea de defensa, de inmunidad innata, no específica la constituyen la piel, el reflejo de la tos, las cilias del epitelio, a nivel humoral el complemento, la lisosima, la fibronectina y citoquinas y nivel celular los fagocitos, neutrofilos, monocitos, esosinófilos y las células natural Killer.

La segunda línea de defensa, de inmunidad específica, está a cargo de las inmunoglobulinas A entre los mecanismos superficiales y los anticuerpos (IgM- IgG), como defensa humoral y la inmunidad mediada por células como defensa celular.

La entrada de una bacteria al endotelio pulmonar produce una rápida reacción pulmonar que se define como la "respuesta inflamatoria pulmonar", proceso éste que se da en etapas:

- la bacteria se recubre del líquido de revestimiento alveolar.
- se activa el complemento. La cascada del complemento se activa por la vía alternativa o si está presente la IgG específica, por la vía clásica, con la liberación de quimiotaxina alveolar (C5a).
- finalmente ocurre el reconocimiento de la bacteria y su captación por el macrófago.

En este momento el macrófago comienza a liberar IL-8, IL1 y FNT y estimula la llegada de PMN y otras células a participar en el proceso de defensa.

La mayoría de los casos de neumonía tienen como agente etiológico a *Streptococcus pneumoniae* : aproximadamente 20/100000 de los casos en adultos jóvenes y 280/100000 en adultos mayores.

Esta incidencia alcanza el máximo en invierno y desciende en verano.

Es una estimulación célula a célula, por acción de las citoquinas.

La generación de factores quimiotácticos y opsoninas ayuda a la fijación e ingestión de la bacteria por los macrófagos alveolares.

Los macrófagos alveolares como los fagocitos, pueden eliminar ciertos microorganismos, pero si el número de éstos aumenta y supera la ca-

pacidad de aquellos para eliminarlos, se activan las citoquinas. Ejemplo de ello se da con microorganismos muy virulentos como *Pseudomonas aeruginosa.* Los macrófagos median en la respuesta inflamatoria, promoviendo la producción de citoquinas que estimulan la producción de mayor cantidad de neutrófilos en el pulmón.

La respuesta inmunitaria mediada por células es esencial para la eliminación de bacterias capsuladas, las de vida intracelular y todas las que han logrado escapar de los macrófagos, como especies de *Mycobacterium* y especies de *Legionella*.

Todo antígeno que logra pasar la barrera de los macrófagos, es identificado por las células dendríticas u otras células presentadoras de antígeno.

Dada la función principal de estas células: interactuar contra los antígenos (los capturan - los procesan y los presentan), colaboran estimulando la función inmune de las células T.

En el parénquima pulmonar la mayoría de los linfocitos son células T (CD4 y CD8) los que cooperan con la destrucción de estos patógenos y se asocian con la generación de respuestas celulares en el huésped.

Como las células dendríticas promueven también la producción de citoquinas, estimulan la función en la respuesta inmune de las células B.

La producción de diversas citoquinas y de interferón colabora en la acción antibacteriana.

Los propios neutrófilos producen citoquinas que tienen propiedades antiinflamatorias por lo que actuarían regulando la respuesta inflamatoria.

El papel de CD4 y CD8 es fundamental, no sólo por su potente acción antibacteriana, sino porque ellos regulan la producción de células supresoras y citotóxicas y de una variedad de mediadores, que también regulan ambas respuestas, la inmune y la inflamatoria.

> Las bacterias

Entre los agentes etiológicos bacterianos de la neumonía aguda, *Streptococcus pneumoniae* (neumococo) ocupa el primer lugar.

Staphylococcus aureus, Haemophilus influenzae, anaerobios, enterobacterias*, Pseudomonas aeruginosa* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNNF), son los más frecuentemente recuperados en esta patología.

Otros patógenos bacterianos, como *Moraxella catarrhalis*, *Legionella pneumophila, Chlamydia pneumoniae, Chlamydia psitacci, Mycoplas-*

ma pneumoniae, *Mycobacterium tuberculosis*, son responsables de la NAC en un porcentaje variable de casos, dependiendo de la epidemiología del lugar.

La neumonía por neumococo se asocia clásicamente a los ancianos y a personas con enfermedad cardiovascular crónica, EPOC (Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica), deficiencia de inmunoglobulinas, neoplasia hematológica e infección por VIH.

Por otro lado, la edad joven asociada a *Mycoplasma pneumoniae*, es sólo una creencia histórica, pues actualmente esta bacteria se la encuentra causando neumonía en adultos sanos de cualquier edad.

En cuanto a la Neumonía Adquirida en la Comunidad (NAC), a pesar de los diversos estudios diagnósticos realizados, los agentes etiológicos involucrados permanecen aún desconocidos entre un 35 y 60% de los casos.

Probablemente esto se deba a técnicas de diagnóstico no adecuadas, mala recolección de las muestras de esputo, pacientes con tratamientos antimicrobianos previos, o a la existencia de microorganismos que ofrecen dificultades para su identificación, como es el caso de *Chlamydias* y *Mycoplasmas.*

Legionella pneumophila, se la asocia a las NAC y también a las neumonías nosocomiales. Esta bacteria emerge cada vez más involucrada en estos cuadros, aún cuando su adquisición permanece no clara, siendo la aerolización y la aspiración (agua contaminada) como las propuestas más aceptables de fuentes de infección.

Staphylococcus aureus, residente normal de las fosas nasales, se asocia a las NAC, con más frecuencia en ancianos y en pacientes con cuadros gripales.

Últimamente han sido señalados bacilos gramnegativos aerobios como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli, Enterobacter* spp., *Acinetobacter* spp. y *Pseudomonas aeruginosa,* agentes etiológicos de las NAC especialmente en ancianos, personas con co-morbilidades y/o enfermedad estructural y en los que requieren internación en cuidados intensivos, con o sin asistencia respiratoria mecánica.

Encontramos a *Pseudomonas aeruginosa*, como agente etiológico de las NAC asociada a EPOC, a bronquiectasias y/o fibrosis quística (F.Q.).

Los anaerobios son capaces de producir NAC en personas con evidencias de aspiración de su propia flora, aún en ausencia de abscesos de pulmón y empiema.

En nuestro país debemos considerar a la tuberculosis, cuyo agente etiológico es el *Mycobacterium tuberculosis*, como otra etiología, pues puede presentarse como una NAC.

H. influenzae y *Moraxella catarrhalis* son bacterias involucradas frecuentemente como agentes etiológicos en ancianos con EPOC, en personas con distintas formas de inmunosupresión y en otras con exacerbaciones de bronquitis crónica. El 80 al 100% de estas cepas son productoras de β-lactamasas.

En cuanto a *Streptococcus pneumoniae*, reconocido agente de las NAC, aunque, con incidencia en descenso en algunas publicaciones, se asocia cada vez con más frecuencia a las neumonías nosocomiales.

En la neumonía nosocomial, son las enterobacterias, BGNF como *Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter* spp. y cocos grampositivos como *Staphylococcus aureus*, los agentes bacterianos más involucrados.

Staphylococcus aureus, que reside primariamente en las fosas nasales, como revisamos antes, puede colonizar desde allí, piel, axilas, ingle y la región perineal.

Desde estas zonas, por las manos del personal del nosocomio, son diseminados, ayudados por la colonización que se logra por una eficiente adhesión de los microorganismos a las células receptoras del huésped.

Como vimos en las NAC, en la neumonía nosocomial también los anaerobios se asocian a aquellos pacientes que aspiran su propia flora y así se recuperan *Fusobacteirum* spp., *Prevotella melaninogenica* y *Bacteroides* spp., entre los más frecuentes.

Es importante recordar que la neumonía nosocomial, puede tener a múltiples patógenos como agentes etiológicos.

Streptococcus pneumoniae (neumococo)

Es un microorganismo anaerobio facultativo, inmóvil y no esporulado, que fue identificado como causa de neumonía entre los años 1880-1890. Hacia 1974 se le dio el nombre de *Streptococus pneumoniae*.

Se han identificado 90 serotipos.

No produce catalasa ni peroxidasa por lo que la acumulación de peróxido de hidrógeno destruye a la bacteria, lo que se evita agregando catalasa al medio de cultivo (agregando eritrocitos : medio de cultivo agar sangre).

Es un coco grampositivo, de forma ovoide o de lanceta (lanceolado), que habitualmente se presenta como diplococo y en cadenas cortas algunas veces. Individualmente las células miden entre 0,5 a 1,25 μm de diámetro. Es inmóvil y no forma esporas y es un miembro alfa hemolítico del género *Streptococcus.* Posee una cápsula de polisacárido que permite su tipificación con antisueros específicos.

Si bien se presenta en forma de diplococo generalmente, existen algunos factores que pueden inducir la formación de cadenas.

Neumococo es un patógeno casi exclusivamente humano causante de un gran número de infecciones como neumonía, endocarditis y de procesos invasivos severos como meningitis, septicemia, etc. particularmente en ancianos, niños y personas inmunodeprimidas.

El hábitat natural de neumococo es la faringe.

La solubilidad en bilis y el ser inhibido por la optoquina lo diferencian de los estreptococos viridans. La mayoría de estas cepas de neumococos, alrededor del 98%, son sensibles a etilhidrocupeina (optoquina) y ademas casi todas se disuelven por acción de sales biliares.

Los principales componentes de su pared celular son el peptidoglicano y el ácido teicoico y la integridad de la pared está dada por la presencia de cadenas laterales peptídicas entrelazadas entre sí por enzimas como las transpeptidasas y carboxipeptidasas, enzimas que son inactivadas por los antimicrobianos β-lactámicos. Se trata de cocos gram positivos que crecen en cadenas. Carecen de la enzima catalasa.

Por tratarse de microorganismos fastidiosos, requieren medios de cultivos con aporte de proteínas y suplementos hematológicos, temperatura adecuada y atmósfera de 8 a 10 % de CO_2 para su desarrollo y un pH óptimo de 7,4- 7,8. En el medio de agar sangre al 5% en CO_2, las colonias son pequeñas, brillantes, en forma de cúpula, y presentan hemólisis α, (digestión parcial de la hemoglobina) que da a las colonias color verdoso. Miden alrededor de 1 mm de diámetro. Su aspecto es umbilicado con depresión central producida por autólisis progresiva.

En anaerobiosis, debido a la neumolisina que es O_2 lábil, las colonias se presentan circundadas por una zona de β-hemólisis.

Son además microorganismos frágiles, fácilmente autolisados por su autolisina.

Streptococcus pneumoniae es un microorganismo patógeno capaz de causar diversas infecciones y procesos invasivos severos.

El camino al Daño

S. pneumoniae se une a las células nasofaringeas humanas por la interacción específica de las adhesinas de la superficie bacteriana, como el antígeno A de la superficie neumocócica o las proteínas de unión a colina, con los receptores de las células epiteliales.

Los posibles sitios de unión pueden ser: glucoconjugados de células epiteliales o el glucolípido aislado. A esta adherencia también contribuye la variación de la fase neumocócica y los organismos pasan de ser transparentes a opacos.

Luego de la colonización de la nasofaringe se produce una infección si los microorganismos pasan a zonas adyacentes como: senos paranasales, trompa de Eustaquio y no se eliminan dado el edema de la mucosa que se produce por el mismo microorganismo.

También aparece neumonía si los microorganismos se inhalan por los bronquiolos o los alvéolos y no son eliminados. La presencia de infección vírica, humo de cigarrillo u otra sustancia tóxica que incrementan la cantidad de mucus y la disminución de la acción ciliar, pueden ser responsables.

Además se ha demostrado que los neumococos se unen a los neumocitos luego de la infección vírica. Los neumocitos activados por citoquinas expresan el receptor del factor activador de plaquetas. Así el receptor se une a residuo de fosforilcolina de la sustancia C y eso aumenta la adherencia de los neumococos.

Luego que éstos alcanzan una zona no habitual activan el complemento por la vía clásica y alterna, se producen citocinas y la atracción de neutrófilos para la fagocitosis, pero la cápsula es resistente a ella. Y como la bacteria no puede ser fagocitada comienza la infección, la cual se puede diseminar a espacios articulares, meninges, cavidad peritoneal, etc.

La patogenicidad de este microorganismo está dada por el potencial de estimular inflamación y lesión de tejidos, todo debido a su encapsulación, ya que los neumococos no encapsulados casi nunca causan enfermedad invasora.

Los síntomas de la enfermedad que produce esta bacteria se deben a la inflamación de los tejidos, lo que aumenta la presión intracavitaria (otitis, meningitis y neumonía).

Cuando invade el SNC en la meningitis produce lesión neuronal. También en la patogenicidad actúa la autolisina que al producir la lisis de la bacteria ésta vierte sus contenidos y aumenta la inflamación.

También en la meningitis se liberan aminoácidos excitadores por el tejido neuronal lo que contribuye a las lesiones de esta enfermedad.

En la virulencia intervienen fundamentalmente:

> La pared celular

Los principales componentes de la pared celular son el peptidoglican y el acido teicoico (activadores de la inflamación meníngea) y la integridad de la pared esta dado por la presencia de cadenas laterales peptídicas entrelazadas entre sí por acción de enzimas como las transpeptidasas y carboxipeptidasas. Estas enzimas son inactivadas por algunos antimicrobianos como los β-lactámicos.

Los componentes de la pared celular son potentes estímulos de la respuesta inflamatoria los que aún solos, recrean los síntomas de la neumonía, de la otitis y meningitis, en modelos experimentales.

Se han encontrado evidencias de que, también los componentes de la pared celular pueden mediar en la adherencia a las células endoteliales. Células que sufren daño importante, por los productos secretados por la bacteria como ocurre en la meningitis neumocócica (**Capítulo 6**).

El inicio de la colonización y o infección comienza por la adhesión a las superficies celulares en especial a las células de la faringe.

Neumococo interactúa con receptores de las células epiteliales, como la fracción N-acetilglucosamina-galactosa de los glicolípidos de la superficie celular, mediante sus adhesinas de superficie, conocidas como "adhesina de superficie neumocócica A" y las proteínas de unión a la colina.

En la otitis media producida por neumococo, se vio que estas cepas se adhieren en gran número.

> La cápsula polisacárida

Neumococo es el paradigma del microorganismo extracelular que causa daño al huésped mientras se encuentre fuera de la célula fagocítica.

Entre los más destacados factores de virulencia de neumococo, la cápsula ocupa un importante lugar. Las cepas capsuladas son las más virulentas ya que la cápsula les da protección contra la fagocitosis.

La cápsula es una sustancia mucoide, resbaladiza que impide que los fagocitos tomen contacto con la bacteria. Es antigénica, y además de dar-

le a las colonias de los neumococos aspecto mucoide, liso, y permitir su tipificación en tipos capsulares y antigénicos, posibilita la invasión y diseminación del microorganismo, aún a sitios remotos, dada la resistencia a la fagocitosis que le confiere.

La ausencia de receptores para dicha cápsula en los fagocitos (los neumococos no son reconocidos por la primera línea de defensa humoral, la vía alternativa del complemento que normalmente opsoniza las bacterias para luego ser fagocitadas, hecho que ocurre en las infecciones severas con importante inóculo), o la existencia de fuerzas electroquímicas que los repelen o aún la inactivación del complemento, son mecanismos que intentan explicar esta resistencia a la fagocitosis.

Por cualquiera de éstos u otros mecanismos, los neumococos capsulados se vuelven "furtivos" a los fagocitos.

Se conocen ya más de 90 serotipos diferentes, cada uno de los cuales reacciona con un antisuero diferente.

La complejidad antigénica capsular del neumococo explica en parte la elevada incidencia y severidad de las infecciones por este microorganismo. La inmunidad es serotipo específica. Existen variaciones regionales en la prevalencia de los serotipos, situación que dificulta las estrategias vacunales.

Actualmente predominan en las neumonías, los serotipos 3, 4, 5, 9N, 10 A, 11A, 14 y 19.

Al ser neumococo el prototipo de patógeno bacteriano que daña mientras permanece fuera del fagocito, las defensas del huésped transitan por las defensas humorales, los anticuerpos, el complemento, fagocitos y neutrófilos.

El polisacárido capsular es antigénico, serotipo específico. Forma anticuerpos protectores. Si existen anticuerpos contra el polisacárido capsular, que aparecen normalmente desde la colonización, se combinan en forma específica y la bacteria queda susceptible a la fagocitosis.

En aquellas personas que no producen cantidad de anticuerpos suficiente, (que padecen mieloma múltiple, inmunodepresión y otras patologías similares), la susceptibilidad a la enfermedad neumocócica es elevada.

Ya que no hay aún pruebas suficientes de que anticuerpos contra los otros componentes celulares sean protectores, se debe prevenir la infección hasta que aparezcan anticuerpos contra la cápsula.

> Las enzimas

Factores secretados por neumococo han sido implicados como desencadenantes de la injuria a las células endoteliales, lo que sugiere que la diseminación es un proceso de destrucción mediado por la liberación de estos productos.

- neuraminidasa: es producida por muchos de los microorganismos que colonizan el tracto respiratorio. Es uno más de los factores que contribuyen a la proliferación del microorganismo en nasofaringe y secreciones mucosas del árbol bronquial y a su posterior invasividad.
- proteasas: son proteasas extracelulares que degradan las inmunoglobulinas, por lo que tienen un papel importante en la colonización de mucosas.
- hemolisinas: son exotoxinas involucradas en la virulencia.

Dos hemolisinas han sido bien descriptas, de las que la neumolisina es la más potente. Es una hemolisina de propiedades semejantes a la estreptolisina O. Es citotóxica para las células epiteliales y fagocíticas. Es liberada por lisis del neumococo. Esta neumolisina degrada la hemoglobina a un producto verdoso de degeneración y causa hemólisis α en agar sangre, por lo que se clasifica al microorganismo como α-hemolítico. Otras propiedades de la neumolisina: enlentece las cilias, produce cambios en la ultraestructura del epitelio ciliado y produce además interrupciones en la integridad del epitelio. La neumolisina puede estimular la inflamación al activar el complemento, promoviendo la liberación del FNT y de interleuquina I (IL-I), lo que facilita la invasión del torrente sanguíneo al alterar la permeabilidad alveolar. Se conoce además que, al eliminar el gen que la produce, disminuye la virulencia, al menos en modelo animal.

Idéntico hallazgo se realizó con la autolisina, enzima encargada de la lisis del neumococo, al disgregar la pared bacteriana, en presencia de agentes tensioactivos y de antimicrobianos. El neumococo es un microorganismo muy frágil, fragilidad que se le atribuye a la autolisina.

Esta autolisina está asociada también a un incremento de la virulencia del microorganismo al participar en la liberación de la neumolisina y exponer otros componentes de la célula bacteriana a los tejidos del huésped.

Las cepas que carecen de autolisina son menos virulentas.

Otro elemento de interés inmunológico es la llamada sustancia C. Es una colina que forma parte del ácido teicoico de la pared celular, es específica y está presente en todas las cepas. Esta sustancia C es la responsa-

ble de la reacción entre los neumococos y ciertas proteínas (β- globulina no anticuerpo presente en bajas concentraciones en el suero de la mayoría de las personas) que aparecen aumentadas en ciertas enfermedades, llamada también "reactivos de fase aguda o proteína C reactiva"- porque reaccionan con la sustancia C.

Esta proteína C reactiva aumenta no sólo en infecciones por neumococo sino en otras enfermedades inflamatorias agudas.

Al reaccionar la proteína C reactiva con la sustancia C se forma un complejo que activa la cascada del complemento, que conduce a la liberación de mediadores inflamatorios y a la opsonización de las bacterias, para mejorar la fagocitosis.

Streptococcus pneumoniae es un habitante normal del tracto respiratorio superior.

Coloniza la nasofaringe y se aisla entre el 5-10% en los adultos sanos y del 20-40% de los niños.

Luego de su colonización, los neumococos pueden persistir de 2-4 semanas y en algunos casos hasta 6 meses en el tracto respiratorio.

El contagio se produce por contacto próximo prolongado y este aumenta si se da en espacios cerrados. También las salas cuna son lugares de diseminación para los niños y para los adultos las aglomeraciones como albergues, prisiones, hogares de ancianos, entre otros. La incidencia es elevada en lactantes de hasta 2 años y baja en adolescentes y adultos jóvenes y la tasa se eleva luego de los 55 años.

Desde las vías respiratorias superiores pueden los microorganismos, progresar hasta el pulmón y oído medio.

La inflamación del oído medio es causada por los componentes de la pared celular y la neumolisina, la que agrega citotoxicidad a las células ciliadas de la cóclea.

Esta bacteria causa neumonía usualmente de tipo lobar, sinusitis, otitis media, meningitis y otras infecciones invasivas.

La patogénesis de este microorganismo en la neumonía, ya la tratamos en párrafos anteriores en: **neumonía aguda**.

Bacilos gran negativos no fermentadores (BGNNF)

> *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas significa falsa unidad, derivado del griego pseudo, que significa falso y monas que significa unidad simple.

Pseudomonas aeruginosa es de las pseudomonas, por su incidencia y virulencia, la más importante como agente etiológico de diversas infecciones.

Se trata de una bacteria que ha sufrido y sufre constantes cambios taxonómicos. Estos grandes cambios en la nomenclatura se deben a los estudios basados en el análisis de genotipo. Si bien los métodos moleculares ayudaron en la ubicación taxonómica, aun no solucionaron todo el tema y permanecen grupos sin ubicación clara y definitiva.

Pseudomonas aeruginosa pertenece a los bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNNF) que constituyen un grupo heterogéneo de bacterias que no fermentan los hidratos de carbono y que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Puede ser recuperada de muestras de suelo, aguas de plantas y animales y muchas de ellas son oportunistas pero todas las cepas son potencialmente patógenas para el hombre.

Otras especies dentro del mismo género se encuentran también ampliamente distribuidas en la naturaleza, como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* y *P. alcaligenes*. Muchas de ellas pueden infectar a plantas.

Las infecciones más frecuentes de los BGNNF son ocasionadas por las especies *Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii-calcoaceticus y Stenotrophomonas maltophilia.*

En cambio *Burkholderia pseudomallei, Burkholderia mallei, Brucellas* spp., y *Francisella* spp., son siempre considerados patógenos para el hombre. Actualmente desde el punto de vista taxonómico la clasificación de los BGNNF es muy compleja.

Según el Consenso de BGNNF publicado en la Revista de la Asociación Argentina de Microbiologia (2011) 43:136-153: “Estos microorganismos pertenecen al dominio Bacteria (*Eubacteria*) y dentro de este a dos phylum: *Proteobacteria* y *Flavobacteria*. Dentro de las *Proteobacterias* en tres clases se encuentran los BGNNF, de importancia clínica: *a-Proteobacteria*, *b-Proteobacteria* y *g-Proteobacteria* y dentro del phylum Flavobacteria los BGNNF se encuentran en dos clases: *Flavobacteria* y *Sphingobacteria*.

Las especies recuperadas de infecciones humanas se encuentran en las -Proteobacteria(familia *Pseudomonadaceae*, familia *Moraxellaceae*, *Acinetobacte*r spp., familia *Xanthomonadaceae*: *S maltophilia*.)

También la taxonomía del género *Acinetobacter* ha sufrido cambios.

Este género actualmente contiene 33 genoespecies de las cuales 21 tienen denominación y de ellas solo 12 han sido recuperadas de muestras clínicas: *Acinetobacter baumannii*, *A. calcoaceticus*, A. haemolyticus, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A.lwoffii*, *A. radioresistens*, *A. ursingii*, *A schindleri*, *A. parvus*, *Abeijerinckii* y *A. gyllenbergii*…".

Tabla 1. Nomenclatura actualizada de los BGNNF.*

Nomenclatura actual	Nomenclatura/s previa/s
Complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* *Acinetobacter calcoaceticus* (genomoespecies 1, 2, 3 y 13)	*Alcaligenes faecalis Alcaligenes odorans*
Achromobacter xylosoxidans	*Alcaligenes xylosoxidans* subsp. xylosoxidans
Brevundimonas diminuta	*Pseudomonas diminuta*
Brevundimonas vesicularis	*Pseudomonas vesicularis*
Complejo *Burkholderia cepacia*	*Pseudomonas cepacia*
Pseudomonas multivorans	*Pseudomonas kingii*
Burkholderia pseudomallei	*Pseudomonas pseudomallei*
Chryseobacterium gleum-indologenes	*Flavobacterium* IIb
Elizabethkingia meningoseptica	*Chryseobacterium meningosepticum*
	Flavobacterium meningosepticum
Delftia acidovorans	*Comamonas acidovorans/Pseudomonas acidovorans*
Myroides spp.	*Flavobacterium odoratum*
Ochrobactrum anthropi	CDC Vd-1 y Vd-2
	Achromobacter biotipo 1 y 2
	Achromobacter grupo A, C, D
Pseudomonas stutzeri	CDC Vb-1
Shewanella putrefaciens/algae	*Pseudomonas putrefaciens/Alteromonas putrefaciens*
Stenotrophomonas maltophilia	*Xanthomonas maltophilia/Pseudomonas maltophilia*

*Rev. argent. microbiol. vol.43 no.2 Ciudad Autónoma de Buenos Aires jun. 201.

La amplia difusión de *Pseudomonas aeruginosa* reside en su facilidad para sobrevivir sin requerimientos nutricionales exigentes. El crecimiento en agua destilada, da cuenta de ello. Su tolerancia a una amplia variedad de condiciones físicas, incluyendo temperatura, 37 o 42 ºC, contribuye a su diseminación en la naturaleza, con predilección por los ambien-

tes húmedos. Estas bacterias son habitantes comunes de agua y suelo. Se los encuentra frecuentemente en la superficie de plantas y ocasionalmente en la superficie de animales.

Se trata de un bacilo gramnegativo recto o ligeramente curvado, de longitud que varía entre 1 a 3 µ m y 0,5 a 1 µ m de ancho.

Está considerada la expresión paradigmática de un patógeno oportunista en humanos.

En los huéspedes vulnerables, por sus defensas alteradas, ocurren la casi totalidad de las infecciones por esta bacteria.

Por ello *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista que causa además de infección del tracto respiratorio, dermatitis, infecciones de tejidos blandos, de huesos, bacteriemia, infecciones del tracto urinario (ITU) y una variedad de infecciones sistémicas, en especial en pacientes quemados severos, con cáncer, sida, y en general en el inmunosuprimido.

Es primariamente un patógeno nosocomial, responsable de infecciones en diferentes sitios del huésped, con marcada severidad a veces.

Como vimos anteriormente, las infecciones respiratorias causadas por *Ps. aeruginosa* ocurren casi exclusivamente en individuos con compromiso del tracto respiratorio bajo o compromiso de sus mecanismos de defensas a nivel sistémico.

La neumonía ocurre en pacientes con enfermedad pulmonar crónica o falla cardíaca congestiva y la neumonía bacteriémica se da en pacientes neutropénicos, oncológicos y bajo quimioterapia.

P. aeruginosa también produce varios tipos de pigmentos. La piocianina, soluble en cloroformo está asociada a "pus azul", característico de infecciones supurativas causadas por esta bacteria. La pioverdina de color amarillo verdosa y soluble en agua, la piorubina de color rojo y la piomelanina de color negro.

Se destacan tres antígenos, el somático O, el flagelar H y el mucoide M.

Los antígenos O son propios de cada especie y permiten la serotipificación O. Hay por lo menos 17 antígenos O reconocidos.

Como toda bacteria gramnegativa, *P. aeruginosa* tiene una estructura celular envolvente y produce una variedad de toxinas y enzimas.

Siempre la patogénesis es un fenómeno multifactorial, lo que se entiende por el amplio rango y número de determinantes de virulencia de este microorganismo.

La mayoría de las infecciones tienen como mecanismo la invasión y la toxicidad.

El camino al Daño

En el camino al daño por este microorganismo, podemos distinguir tres fases, la colonización- la invasión local y la enfermedad sistémica diseminada.

No todos los procesos infecciosos harán estas tres fases, pudiendo algunos definirse en una de ellas.

> Fase de colonización

Ya comentamos lo dificultoso que resulta ubicar una fuente de colonización, por las características de la ubicuidad de este microorganismo en el medio ambiente.

Expresan adhesinas, (fimbrias), capaces de adherirse a las células epiteliales del tracto respiratorio alto y a otras células epiteliales, incluso a superficies inertes como el vidrio y el látex.

Las células epiteliales, en situaciones normales, están protegidas por la fibronectina, que evita la adherencia de bacilos gramnegativos.

Cuando este receptor desaparece o se degrada, situación que se da en pacientes hospitalizados o con daño estructural de sus vías respiratorias, la adhesión de bacilos gramnegativos se facilita.

Por sus fimbrias, *P. aeruginosa* adhiere a las células epiteliales del tracto respiratorio alto, uniéndose a sus receptores específicos: galactosa o manosa o ácido siálico, constituyendo el primer paso en el daño, la colonización.

Esta adherencia es ayudada por la producción de una proteasa que degrada la fibronectina, exponiendo mejor los receptores en la superficie de las células epiteliales.

La presencia de tejidos dañados previamente, como en el caso de daño previo por infecciones virales, facilita la adherencia de la bacteria a las células epiteliales de la tráquea, situación que no ocurre en tejidos sanos. Esta circunstancia previa sería relevante en infecciones del tracto respiratorio en humanos y también en infecciones del tracto urinario y ocular.

Esta bacteria produce un exopolisacárido mucoide (alginato) que funciona como adhesina adicional para adherir al epitelio del tracto respiratorio y que semeja una capa de este mucus extracelular, denominado también glicocálix o sustancia mucoide, con apariencia de una cápsula.

Este alginato forma una matriz (slime-biopelícula) alrededor de la bacteria, anclándola a su medio ambiente y a sus células hermanas, y la protege de las defensas del huésped, (linfocitos, fagocitos, acción ciliar, anticuerpos, complemento) confiriendo además, resistencia a antimicrobianos **(Capítulo 1).**

También en ambientes acuosos esta bacteria se adhiere a superficies, produciendo esta biopelícula.

La formación de estos cúmulos de bacterias y material extracelular representa un problema de salud pues contamina dispositivos que se implantan dentro del cuerpo, como por ejemplo dispositivos intrauterinos, catéteres o válvulas cardiacas. Las biopelículas también representan un problema en el proceso de producción de diversas industrias pues provocan taponamiento y corrosión de conexiones y filtros.

Las cepas recuperadas del medio ambiente y de pacientes con diversas infecciones hospitalarias, aunque producen escasas concentraciones del alginato, se consideran no mucoides.

La colonización del tracto respiratorio bajo, en pacientes con fibrosis quística (F.Q) por estas cepas mucoides de *P. aeruginosa*, es muy frecuente y de difícil, si no imposible erradicación ya que colonizan muy eficientemente y a medida que progresa la infección se seleccionan derivados mucoides de la bacteria que producen grandes cantidades del exopolisacárido alginato. Por ello, establecida la infección en los pulmones de estos pacientes, por estas cepas, no pueden ser eliminadas por el sistema inmune y no se logra erradicación de las mismas, constituyéndose en el factor principal de morbilidad y mortalidad en estos pacientes.

Está demostrada una mayor resistencia a la opsonización en las cepas mucoides, en comparación con las cepas no mucoides que producen cantidades muy pequeñas de alginato, y que constituyen la inmensa mayoría de los aislamientos clínicos o ambientales de esta bacteria.

Las cepas que producen abundante cantidad de glicocálix, con el aspecto extremadamente mucoide, son aisladas frecuentemente en el esputo de pacientes no solo con F.Q., también con EPOC y en infecciones en pacientes con catéteres urinarios implantados.

P. aeruginosa tiene dos formas de desplazarse: en medios líquidos se desplaza "nadando" mediante un único flagelo polar, mientras que sobre las superficies se mueve, independientemente de la presencia del flagelo, por un mecanismo llamado "twitching" que depende de las fimbrias o pili, movimientos que participan de la formación de slime.

Como se comenta en **Capitulo 5** en *Staphylococcus aureus*, en muchas bacterias como *P. aeruginosa* muchos de los factores de virulencia no actúan al unísono, sino que su aparición está regulada genéticamente. Un ejemplo de regulación es el sistema *agr,* llamado de autoinducción, es el más conocido. Llamado también "el paradigma de la regulación genética de la virulencia de *Staphylococcus aureus"* Mediante este mecanismo de regulación la bacteria modifica la expresión de distintos genes promoviendo cambios que no dependen del medio ambiente sino de la densidad celular en la población bacteriana.

Este sistema regulatorio detecta cuándo se ha llegado a una masa crítica de bacterias por lo que se le ha denominado "sensor de quorum" o "quorum sensing". Por este mecanismo de autoinducción o "quorum sensing" las bacterias determinan su propia densidad poblacional recurriendo a sensores o moléculas inductoras, a fin de regular la elaboración de sus productos. El *agr* funciona como un sensor que controla la densidad poblacional. Se gatilla ante la densidad poblacional elevada. Regula, entre otros componentes, la formación de cápsula.

Es interesante mencionar que los aislamientos mucoides de enfermos con FQ producen muy bajos niveles de proteasas y otros factores de virulencia regulados por el sistema sensor de quorum.

En *P. aeruginosa* varias exotoxinas como las S y T que funcionan como ADP-ribosil transferasa y la toxina Y recientemente descripta que eleva el Amp cíclico, ya que tiene actividad de adenilato ciclasa, se translocan a las células eucariotas mediante el sistema de secreción tipo III.

Este sistema de secreción tipo III transloca las proteínas directamente de la bacteria a la célula eucariota, por lo que se encuentra presente en bacterias patógenas de plantas o animales (**Capitulo 1**).

P. aeruginosa forma un único flagelo polar que, entre otras funciones, da a la bacteria movilidad y capacidad para unirse a los tejidos del huésped.

Otras sustancias de la bacteria están también involucradas en la adherencia, la que es muy compleja.

> Fase de invasión

La habilidad de *P. aeruginosa* para invadir los tejidos depende, de la producción de enzimas extracelulares y toxinas que rompen barreras celulares y dañan las células del huésped, así como sus defensas inmunes.

Dos de las enzimas extracelulares proteolíticas denominadas proteasas, contribuyen al mayor daño: la elastasa y la colagenasa.

La elastasa daña tejidos- degrada proteínas plasmáticas- inmunoglobulinas- factores de coagulación y complemento- hidroliza elastina de las paredes arteriales e incrementa los efectos de la exotoxina A en las infecciones pulmonares.

La colagenasa hidroliza el colágeno en el tejido conjuntivo, importante también en las infecciones de la córnea.

Estas enzimas se involucran en las lesiones cutáneas hemorrágicas que aparecen en algunos casos.

Otras proteínas solubles como, proteasas, además de citotoxinas, hemolisinas, leucocidinas, sideróforos y la producción de un pigmento difusible, como la piocianina, contribuyen a la invasión de este microorganismo.

La producción de la piochelina, sideróforo que le posibilita el rescate del hierro, es otro mecanismo que contribuye a su supervivencia y a su patogenicidad.

> Fase de diseminación

Varios factores se ponen en juego en esta etapa del daño.

La movilidad está sustentada por la presencia de flagelos, como vimos, y la toxicidad por la producción de toxinas como la exotoxina A y el LPS.

P. aeruginosa es resistente a la fagocitosis y a la acción bactericida del suero, debido probablemente a su cápsula mucosa y a su LPS.

El LPS sí es fundamental en la resistencia a las defensas innatas del huésped. Sus cadenas laterales O, previenen la lisis por parte del complemento en cepas de infecciones hospitalarias y en las cepas ambientales.

El LPS, con su lípido A, como en todas las bacterias gramnegativas, media en la aparición de fiebre, hipotensión, coagulación intravascular y todos los potenciales efectos patológicos de los gramnegativos **(Capítulo 1).** En la F.Q. el lípido A se altera estructuralmente, modificando la respuesta inflamatoria del huésped, lo que colabora en la patogenia.

Además las proteasas inactivan el complemento, clivan los anticuerpos IgG e inactivan el FNT y otras citoquinas.

Entre las proteínas que intervienen en la infección encontramos toxinas, además de S y T, las exotoxinas A y S, así como enzimas hidrolíticas

que degradan las membranas y el tejido conjuntivo de diversos órganos. Esta situación se ve agravada por la dificultad para tratar las infecciones por esta bacteria, ya que presenta una muy alta resistencia natural a distintos antimicrobianos y desinfectantes.

La exotoxina A se asocia fuertemente al daño durante la diseminación, llevando a la muerte celular. Es una toxina de acción semejante a la exotoxina de *Corynebacterium diphtheriae*, del grupo que inactiva la síntesis de proteínas por inactivación del factor de elongación EF-2 (**Capítulo 1**).

En la neumonía, las cepas toxigénicas causan mayor daño por ser más virulentas que las no toxigénicas. Su participación en la virulencia está demostrada por la mejor sobrevida de pacientes con sepsis por *P. aeruginosa*, si éstos tienen título importantes de anti-exotoxina A en su suero. Cepas con el gen *tox* deleteado, son menos virulentas en modelos animales.

Otra toxina como la exoenzima S, se la asocia a las lesiones necróticas que aparecen en la neumonía.

También la hemolisina fosforilada C, contribuye a la invasividad, al destruir el surfactante pulmonar y atacar los tejidos pulmonares, llevando a la necrosis y al colapso parcial del pulmón.

Es de destacar la polirresistencia a los antimicrobianos que se presenta en este microorganismo debido a la permeabilidad de su barrera, que le proporciona su membrana externa, el LPS.

Además, en aquellas cepas con tendencia a colonizar superficies mediante el biofilm, se hacen impermeables a concentraciones terapéuticas de antimicrobianos y a otras sustancias, participantes en las defensas del huésped.

Otro mecanismo de resistencia a antimicrobianos es mediante plásmidos, los que son trasferidos por conjugación o transducción a otras bacterias.

> *Corynebacterium diphtheriae*

Llamado también bacilo de Loeffler.

Es un bacilo grampositivo que se presenta con morfología característica en letras chinas como L, X, Y, V, recordando al género *Actinomyces*.

Su nombre, *Corynebacterium diphtheriae,* deriva del griego:korynei (garrote) por las formas de sus extremos, y diphtheria (piel) por las membranas que produce.

Es un bacilo pleomórfico, inmóvil de 2 a 8 µm por 0,5 a 1 µm. No produce esporas ni es capsulado.

Los corpúsculos de Babes-Ernst, que son granulaciones metacromáticas de polifosfatos, ayudan en la visualización microscópica con colorante de Löeffler.

Es aerobio y anaerobio facultativo. Requiere para su desarrollo, de medios exigentes enriquecidos con suero. El medio de Löeffler, con base de suero de caballo y caldo glucosado posibilita un buen desarrollo en horas.

De acuerdo al tipo de colonias formadas en los medios de cultivo, *Corynebacterium diphtheriae* se clasifica en cuatro biotipos, los que no están relacionados con el poder patógeno de la bacteria:

Biotipo *gravis*: colonias grandes, semirrugosas, grises, fermentan almidón y glucógeno y no son hemolíticas.

Biotipo *intermedius*: colonias pequeñas, lisas con centro negro, no fermentan almidón ni glucógeno y son hemolíticas.

Biotipos *mitis* y *belfanti*: colonias más pequeñas, negras, convexas, no fermentan almidón y glucógeno y son hemolíticas.

La patogenicidad de este microorganismo se asocia a dos propiedades: invasión y toxicidad.

El camino al Daño

> Invasividad

Las cepas toxigénicas y las no toxigénicas pueden colonizar las membranas mucosas, lo que habla de que otros factores, además de la toxicidad, contribuyen a la difusión del microorganismo y su habilidad para establecerse y mantenerse en el huésped humano.

La invasión de los tejidos locales involucra la colonización y la posterior proliferación. Se multiplica sobre la superficie de las células epiteliales del cuerpo (nariz, garganta, piel).

La formación de la membrana característica de la difteria, se asocia con esta invasión de tejidos locales, al necrosar las células de las mucosas.

Si bien es poco conocida aún la adherencia, la colonización está asociada a la producción de neuraminidasa y la diseminación a la producción de hialuronidasa.

También colaboran en la resistencia a la fagocitosis el antígeno K (antifagocitario) y el factor cordón, semejante a lo que ocurre en tuberculosis, interfiriendo también en la cadena respiratoria y en la fosforilación.

> Toxicidad

La toxina causa la muerte de las células eucarióticas por inhibición de la síntesis proteica.

Si bien la toxicidad es responsable de los síntomas más severos de la difteria, no es el único factor responsable de la patogenicidad de este microorganismo ya que, distintas etapas de la invasión preceden a la toxigenicidad.

Dos factores están fuertemente involucrados en la toxigenicidad: la baja concentración de hierro y la presencia de un profago en el cromosoma bacteriano.

La influencia de las bajas concentraciones de hierro en la toxigenicidad se soporta en el conocimiento de que el gen para la elaboración de la toxina, si bien está en el cromosoma del profago, es controlado en su producción, por una proteína represora y este represor es activado por el hierro.

La toxina es una toxina del tipo A-B y debe atravesar la barrera de la membrana celular y alcanzar su blanco en el citoplasma. Sólo es elaborada por cepas de *C. diphtheriae* infectadas por un bacteriófago que transporta el gen estructural para su producción.

La toxina se une a su sitio receptor específico de las células susceptibles y es introducida por receptores, mediante un proceso de endocitosis. La acidificación de la vesícula endosomal posibilita esta penetración.

Aparentemente, como resultado de la actividad de la membrana endosomal, la subunidad A se separa y se libera de la subunidad B, insertándose y atravesando la membrana. Una vez en el citoplasma, el fragmento A recupera su conformación y su actividad enzimática **(Capítulo 1).**

C. diphtheriae está adaptada a la transmisión por el aire a través de las secreciones nasofaríngeas y es muy resistente a la desecación.

C. diphtheriae se aloja en las fauces del huésped o bien en lesiones de piel, diseminándose hacia la nasofaringe, laringe y tráquea.

Muy ocasionalmente la bacteria puede diseminarse desde las vías respiratorias o desde la piel, produciendo infecciones en la sangre, endocarditis y artritis.

Es en estos sitios donde los microorganismos se multiplican y causan daño local y general, mediante la producción de la potente exotoxina.

La acción local se manifiesta como necrosis e inflamación, exhibiendo la pseudomembrana característica, que se encuentra adherida a la mucosa ya sangrante y muy inflamada.

La toxina se absorbe también en el aparato circulatorio y se distribuye por todo el cuerpo, pudiendo llevar a la destrucción de tejidos cardíacos, renal y nervioso, al inhibir la síntesis proteica, por lo que la acción general se manifiesta con trastornos en el corazón, sistema nervioso, riñón y glándulas adrenales.

El diagnóstico se basa en:

- diagnóstico epidemiológico, según contactos e inmunizaciones previas
- diagnóstico clínico, que es característico y singular.
- diagnóstico de laboratorio que debe incluir la demostración de la producción de la toxina por la cepa recuperada.

> *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis es el agente causal de la tuberculosis, una de las enfermedades infectocontagiosas más letales y antiguas que afecta al ser humano y que posee una amplia distribución en el mundo, produciendo cada año la muerte de alrededor de 2 millones de personas.

En la actualidad la tuberculosis constituye una enfermedad reemergente como consecuencia de la aparición de cepas multirresistentes a los fármacos tradicionalmente empleados en el tratamiento de la enfermedad, ya que representa la primera causa de muerte en pacientes con VIH/SIDA.

Según (OPS), una de cada cinco personas que padece de tuberculosis en la región de las Américas (América del Sud, Centroamérica y América del Norte) no sabe que tiene la enfermedad porque no accede a los servicios de salud y no es diagnosticada.

En el año 2012, en las Américas, se registraron casi 220 mil casos y ocurrieron alrededor de 19 mil muertes por esta enfermedad.

En nuestro país, la tuberculosis continúa siendo un problema de Salud Pública. Se notifican anualmente 10000 casos y cerca de 700 muertes, hacia el año según últimas estadísticas 2012.

En 2014 se reportó el primer caso de transmisión congénita de TB-MDR (tuberculosis multidroga resistente) ocurrida en Perú (Boletin Asociación Argentina de Microbiología. Boletin 205. Jul-sep 2014).

El *Mycobacterium tuberculosis* es un bacilo ácido alcohol resistente, de características morfológicas muy particulares. Es un bacilo delgado, recto o ligeramente curvo y con extremos redondeados, con un ancho de 0.3 a 0.6 µm de largo, con corpúsculos que semejan un rosario.

Mediante la coloración de Ziehl-Neelsen, los bacilos aparecen como bastones de color rojo brillante (fucsina básica) contra el fondo azul (colorante de contraste-azul de metileno). En algunas situaciones, los bacilos toman la coloración en forma irregular y aparecen como un rosario muy probablemente debido al contenido de polifosfatos y vacuolas.

Es importante recordar que la abundancia de lípidos en la pared celular (60% de su peso seco) explica el carácter hidrófobo de los organismos y la impermeabilidad a los colorantes. La coloración de Ziehl-Neelsen da cuenta de esta característica.

Con aspecto de "bacilos fantasmas" pueden aparecer en la coloración de Gram que no es útil para la identificación definitiva de las micobacterias.

Alrededor de un 30 a 60 % de complejos lipídicos solubles se encuentran en la pared celular de este microorganismo. Entre ellos micósidos, glucolípidos, ésteres trehalosa.

Esta constitución de la pared se asocia a otras propiedades además, como: resistencia a la acción letal de ácidos y álcalis, resistencia a la acción bactericida de los anticuerpos junto con el complemento, resistencia a algunos antimicrobianos, supervivencia dentro del macrófago y lento crecimiento de los microorganismos al dificultar el paso de sustancias nutritivas al interior de la célula.

Mycobacterium tuberculosis es un bacilo aeróbico obligado. No desarrolla en ausencia de oxígeno.

Las características de su pared celular, que mencionamos anteriormente, son responsables del lento crecimiento en los medios de cultivo sólidos recomendados como Lowenstein-Jensen requiriendo entre quince o más días de incubación a 37ºC para iniciar un desarrollo visible y hasta 60 días de incubación para descartar como negativo un cultivo. El desarrollo de este microorganismo es óptimo a pH 7 y a la temperatura de 35 a 37ºC.

Son microorganismos esencialmente aeróbicos, catalasa y peroxidasa positivas.

El desarrollo colonial en el medio típico de Lowenstein-Jensen es en forma de colonias color manteca, pequeñas, secas, rugosas semejando la formación de rosetas.

Las cepas virulentas de *Mycobacterium tuberculosis* crecen en la superficie de los medios líquidos en forma de cordones serpenteantes (los bacilos se agrupan en forma paralela) crecimiento llamado "cordón" o "cuerda", mientras que las cepas avirulentas crecen al azar en forma desordenada.

Este crecimiento de "cordón" o "cuerda" (factor cordón) se asocia a la presencia de un glucolípido (trehalosa 6-6´ dimicolato) ubicado en forma periférica en la bacteria. El factor cordón, que es una cera del bacilo, está asociado a las cepas virulentas e involucrado en propiedades inmunoreactivas.

Otros importantes fenómenos en los cuales está involucrado el factor cordón son:

- Formación de granulomas
- Impedimento de la diapédesis de leucocitos
- Lesiona, in vitro, membranas mitocondriales.

> La cera D

Otros componentes con características inmunorreactivas son variados micósidos.

De ellos, la cera D es de interés.

Si bien no es una cera químicamente, contiene ácidos micólicos y glucopéptido, sustancias que le confieren la propiedad de estimular la inmunogenicidad de variados antígenos y está asociada a la cronicidad de esta enfermedad.

Induce inmunogenicidad de diferentes antígenos, estimulando anticuerpos contra diferentes antígenos proteicos. Duplica la actividad del adyuvante completo de Freund:

- inhibición de la migración de polimorfonucleares provocando la formación de granulomas pulmonares tipo cuerpo extraño.
- protección contra la virulencia de la infección (lo que lo hace muy especial).
- activación de la vía alternativa del complemento.
- propiedades antitumorales.

Otros lípidos como los sulfátidos, llamados también sulfolípidos, participan en algunas reacciones químicas de las cepas virulentas y en algunas situaciones se asocian a la virulencia. Está demostrado que actúan aumentando la toxicidad del factor cordón e inhibiendo la fusión lisosoma-fagosoma. Cuando las cepas ingeridas por los macrófagos son virulentas, la fusión fagosoma-lisosoma se enlentece.

Si bien los factores de virulencia de las bacterias, en general son codificados por cromosomas, plásmidos o bacteriófagos, en este microorganismo los lípidos de la pared se consideran atributos patogénicos multifactoriales aún no totalmente dilucidados.

Dentro de los macrófagos los bacilos evaden la acción bactericida de los mismos, al evitar la fusión de los lisosomas (que contienen enzimas) con los fagosomas (que contienen bacilos) e inhibiendo la difusión de enzimas lisosomales.

Se reconocen así factores de virulencia de naturaleza lipídica, entre ellos los glicolípidos, lipoglicanos y polisacáridos que además de funcionar en la virulencia le confieren protección al mycobacterium y en especial compuestos como el lipoarabinomanano y los fosfatidilinositol manósidos lo ayudan a la evasión de la respuesta inmune del huésped inhibiendo la activación de macrófagos ya infectados.

Estos mecanismos le posibilitan a *Mycobacterium tuberculosis* su vida intracelular.

Mediante la secuenciación del genoma completo se acercaron herramientas útiles para dilucidar la patogenicidad de este microorganismo.

La identificación de genes importantes en la patogenia, como genes reguladores que codifican proteínas que se encuentran en la superficie, involucrados en la síntesis de los lípidos de la pared asociados a la virulencia, aporta a clarificar algunos aspectos de la misma.

La virulencia del *Mycobacterium tuberculosis* es un fenómeno multifactorial debido a la multiplicidad de la naturaleza de diversos factores y moléculas con diferente función y localización involucradas de forma directa o indirecta en los mecanismos de patogenicidad.

> En la patogénesis ocurren dos respuestas

Una alérgica y otra inmunitaria. Ambas respuestas ocurren simultáneamente pero no son equivalentes.

Luego de una primera inoculación se produce un nódulo que se transforma en úlcera – la que se caseifica y necrosa con diseminación de bacilos a ganglios y nuevos focos para terminar en la muerte.

En una segunda inoculación el nódulo es ya circunscripto, evoluciona a úlcera, cicatrización, sin participación de ganglios, sin diseminación, terminando en la cicatrización de esta lesión. En la mayoría de las personas estas lesiones curan espontáneamente y se fibrosan o se calcifican.

En las personas con deficiencias inmunológicas, los bacilos pueden invadir la sangre y por este medio alcanzar cualquier órgano. La consecuencia es de gravedad y elevada letalidad, infección generalizada que se denomina tuberculosis miliar (por la semejanza a granos de mijo de los numerosos tubérculos formados) Hígado, riñón, bazo, cerebro y meninges son los sitios más afectados donde la formación de tubérculos es visible.

La tuberculosis pulmonar posprimaria se desarrolla ante diversas situaciones de alteraciones de la función inmune mediada por células. Infecciones virales o tratamientos con corticoesteroides o con quimioterapia anticancerosa, hacen vulnerable a la persona a la reactivación tuberculosa.

La reinfección exógena puede manifestarse con idénticas características.

En los pacientes, las lesiones caseosas se licuan, de desprende el material y lo eliminan hacia los bronquios quedando cavidades muy aireadas, lo que favorece la multiplicación de los bacilos por su condición aeróbica antes comentada.

Desde estas cavidades las bacterias se diseminan a todo el pulmón y a nuevos focos de infección en todo el cuerpo.

También este contenido cargado de bacterias es eliminado por la tos al exterior manteniendo la cadena de contagio.

Los infectados desarrollan una inmunidad celular dominada por las células T, debido a que los bacilos han sido fagocitados por los macrófagos. Esta activación de las células T, es la base de la reacción cutánea de la tuberculina (proteína elaborada por el bacilo), prueba que se realiza con Derivado Proteico Purificado (PPD) (prueba de Mantoux).

Toda prueba de Mantoux positiva refleja los eventos locales que ocurren en los tejidos infectados, o sea está determinando que la persona ha tenido contacto con el microorganismo.

Las células T reaccionan con estas proteínas y aparece una induración y enrojecimiento en el sitio de la inyección (reacción de hipersensibilidad retardada a las 48 a 72 hrs) es decir, una prueba de Mantoux positiva.

La aparición de cepas multirresistentes a las drogas antituberculosas, es actualmente de gran preocupación. Una cepa multirresistente es aquella que presenta resistencia a isoniazida y rifampicina con o sin resistencia acompañante de otros antimicrobianos antituberculosos. Cepas con multirresistencia llamadas TB-MDR son las nuevas cepas con resistencia a múltiples drogas.

La aparición de la resistencia se explica por ser el mecanismo de la misma, de mutación y selección. Mutaciones espontáneas e irreversibles, independientes de la acción de la droga, preexisten a la misma, llevan a la selección de cepas resistentes por tratamientos mal instaurados. Este mecanismo de la selección de la resistencia, sustenta un tratamiento antituberculoso combinado.

Una monoterapia encubierta, por diversos motivos (mala prescripción, buena prescripción pero no adhesión del paciente), lleva a la emergencia de la resistencia a la única droga que recibe el paciente en dosis terapéuticas.

El complejo *M. tuberculosis* incluye a *M. tuberculosis, M. africanum y M. canetti*. Este complejo infecta exclusivamente a humanos.

M. bovis, M. marinum, M. microtii, M. avium, M. kansaii, y otros, tienen un rango más amplio de hospederos pueden infectar a humanos con lesiones en especial a nivel de piel.

"La tuberculosis humana causada por *M. bovis* es una zoonosis considerada esporádica en países desarrollados, pero sigue siendo un problema poco estudiado en los países de bajos y medianos recursos. La enfermedad en humanos se atribuye principalmente a consumo de productos lácteos no pasteurizados. También se ha reportado la transmisión debido a la exposición a animales infectados, aunque la prevalencia de la infección por tuberculosis y los factores de riesgo asociados han sido insuficientemente caracterizados entre trabajadores lecheros con bajo control de la tuberculosis bovina". (Torres Gonzalez, et al., 2013).

Otras micobacterias que producen enfermedad pulmonar, además de otras localizaciones, son las del Complejo *Mycobacterium avium* (CMA).

El CMA abarca a dos microorganismos relacionados, *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium intracellulare.*

Fundamentalmente CMA, afecta a personas con SIDA y la enfermedad se presenta en forma diseminada. La adquisición de este complejo es generalmente por vía digestiva o inhalatoria desde sus diversos reservorios ambientales, como suelo, agua y polvo doméstico.

Se cree que desde la adquisición de CMA el huésped tarda varios meses o años en manifestar la enfermedad y en pacientes con SIDA se acorta notoriamente la sobrevida de los mismos.

La enfermedad se puede presentar como lesiones tisulares localizadas, pleuritis granulomatosa, bronquitis, vasculitis, neumopatía, fibrosis quística, neumonía intersticial, entre otras.

Se puede aislar este complejo desde muestras de esputo, de sangre y también de aspirados de médula ósea.

El método más eficaz para su recuperación, en el laboratorio, es por hemocultivos por lisis centrifugación.

En este complejo, los factores identificados como posibles factores de virulencia son:

- adherencia a las células epiteliales intestinales
- producción de catalasa
- inhibición de la fusión fago-lisosoma

Las características del CMA asociado a enfermedad diseminada:

- se presenta como colonias lisas, y transparentes en medio de cultivo
- tiene capacidad de inducir citoquinas, como FNT y IL-1
- presenta mayor resistencia múltiple a los antimicrobianos
- in vitro, una variedad de CMA, tiene capacidad de estimular la replicación del VIH

Para finalizar este apartado, reiteramos que:

El conocer la patogenia de la neumonía, el examen físico exhaustivo del paciente, los datos que brinda la anamnesis y la información adecuada del laboratorio de bacteriología, ayudan a estrechar el amplio rango de probables agentes etiológicos y colaborar con un tratamiento empírico racional.

Estudios microbiológicos y su interpretación adecuada y oportuna, colaborarán con la clínica y la instauración o no de tratamientos adecuados y oportunos.

Infección aguda del parénquima pulmonar que se manifiesta por signos y síntomas de infección respiratoria baja, asociada a un infiltrado nuevo en Rx. de tórax producido por dicha infección y se presenta en pacientes no hospitalizados.

La neumonía aguda no solo tiene impacto sobre el individuo que la padece, sino también constituye un problema de salud poblacional por su morbilidad y mortalidad y esta situación no ha variado en forma significativa en los últimos cincuenta años.

De hecho en 1901 Sir William Osler la definió como una de las infecciones más conocida y fatal de todas las enfermedades agudas, es ahora el nuevo capitán de la muerte en el hombre.

En Argentina es la quinta causa más común de muerte en mayores de 50 años y es la sexta causa de muerte en general.

Prestigiosos infectólogos y neumonólogos de nuestro País sostienen que las infecciones bajas del sistema respiratorio afectan a personas mayores de 50 años y se estima que fallecen 15 mil personas cada año en la Argentina, cifra que duplicaria a la tasa de mortalidad de países vecinos como Chile, Brasil y Cuba.

La situación en Argentina amerita un plan que considere distintas estrategias con el objetivo de disminuir la tasa de mortalidad.

El agente etiológico más frecuente de neumonía en nuestro país continua siendo el neumococo por lo cual es imperiosa la necesidad de recurrir a un plan efectivo de inmunización con vacunas antineumococicas **y vacuna antigripal conociendo que la neumonía es una de las complicaciones más comunes de la gripe.**

Diagnóstico

Se realiza recabando datos en la anamnesis en un intento de definir signos y síntomas compatibles con el diagnóstico de neumonía, grupo etario en el que se presenta la infección, defectos en la inmunidad que predisponen al desarrollo de la neumonía y posible exposición a patógenos específicos.

Los signos y síntomas más frecuentes encontrados son:

- Tos.
- Expectoración.
- Disnea y fiebre.
- Otros síntomas no específicos, también pueden estar presentes como: transpiración, cefalea, nausea y mialgias.

Se debe tener presente que en las personas añosas, los síntomas respiratorios como los generales pueden ser menos ostensibles.

La frecuencia de neumonía se incrementa en poblaciones que presentan enfermedades o condiciones clínicas subyacentes: enfermedad pulmonar obstructivas crónicas (EPOC) insuficiencia renal, insuficiencia cardiaca, diabetes mellitus, historia de infección viral previa, VIH/SIDA y alcoholismo.

Examen físico

La fiebre es el signo más usual y está puede tener un patrón continuo o bien presentarse en picos, está puede estar acompañada de escalofríos y transpiración profusa.

Taquipnea es un síntoma muy orientador de afección pulmonar sobre todo cuando se acompaña de disnea, también se puede observar uso de músculos respiratorios accesorios (retracción esternal, aleteo nasal)

Al examen la caja toráxica puede encontrarse los siguientes hallazgos: hipoventilación del bronquio comprometido, auscultación de rales crepitantes, soplo tubarico, otros ruidos también pueden estar presentes como ser rales gruesos y sibilancias, en la percusión se pondrá de manifiesto matidez o submatidez.

Examen de esputo

El examen microscópico y cultivo del esputo expectorado es el principal estudio diagnóstico del laboratorio bacteriológico a pesar de las controversias existentes con respecto a su sensibilidad y especificidad.

Otras tomas de muestras útiles para el diagnóstico son: hemocultivos, aspirado traqueal, lavado bronco alveolar, examen de líquido pleural y en algunas oportunidades biopsia pulmonar.

Estas muestras se realizan en pacientes internados y en asistencia respiratoria mecánica.

Examen radiológico

La radiografía de tórax juega un rol crítico en el diagnóstico de neumonía.

La extensión de las anormalidades radiológicas definen a pacientes que están más enfermos, ciertos rasgos pueden orientar hacia la sospecha de determinado agente etiológico.

Los rasgos radiológicos más frecuentemente encontrados son: infiltrados bronco alveolares, cavitación y presencia de derrame pleural.

Una larga lista de agentes bacterianos, fúngicos, virales y algunos parásitos pueden ser agentes etiológicos de neumonía, por lo cual en la evaluación inicial no se logra un diagnóstico etiológico específico y la terapia que se inicia es empírica.

Al definir síndrome de neumonía basado en parámetro clínicos, radiográficos, laboratorio y epidemiológico que son característicos con probables organismos involucrados pueden ayudar al médico clínico a seleccionar una terapia racional.

En 1993, la Asociación Americana de enfermedades pulmonares desarrollo cuatro grupos de neumonía adquirida en la comunidad, basado en la edad del paciente, necesidad de hospitalización, severidad de la enfermedad y presencia de enfermedades comórbidas.

En 2003 la Sociedad Americana de Infectología desarrollo una guía similar con criterios mayores para seleccionar antibióticos basados en la severidad de la enfermedad, comorbilidades y exposición a determinados patógenos.

El paciente con neumonía aguda adquirida en la comunidad es una persona que está entre los 50 y 60 años, generalmente se presenta con pico estacional (invierno- primavera).

El 50-80% de los afectados tienen una o más enfermedades comórbidas incluyendo EPOC, enfermedad cardiovascular, enfermedades neurológicas, diabetes o abuso de alcohol y cigarrillos e inmunosupresión.

Clásicamente la neumonía aguda adquirida en la comunidad se presenta con inicio súbito de fiebre, escalofríos seguido por dolor pleurítico (dolor en puntada) y producción de esputo mucopurulento.

La presencia de signos y síntomas varían acorde a la edad del paciente, severidad de la infección y el antecedente de la ingestión previa de antimicrobianos.

La combinación de los clásicos hallazgos lo presentan el 80% de los pacientes.

Signos y síntomas respiratorios
Tos 80%
Tos y expectoración 60-80%
Dolor toráxico: 30- 46%
Escalofrió: 40-75%
Fiebre 68-78%
Taquipnea 24-30%
Signos de consolidación pulmonar 29%
Rales crepitantes: 78%

Síntomas y signos no respiratorios
Fatiga 90%
Anorexia 71%
Transpiración 69%
Nausea 41%
Taquicardia 45%

Laboratorio
Leucocitosis 15.000- 35.000/mm3 90%
Leucopenia 5 % (factor de mal pronostico)
Gram de esputo presencia de bacteria
acompañada de reacción inflamatoria 25-50%
Hemocultivos positivos 25-25 %
Hipoxemia 10-20 %

Etiología

El agente que con mayor frecuencia ocasiona neumonía según los diferentes trabajos realizados en el mundo entero (incluido Argentina) es *Streptococcus pneumoniae* que es responsable del 50-60% de las neumonías adquiridas en la comunidad (NAC) y probablemente de la mayoría de los casos de la NAC sin documentación bacteriológica.

Haemophylus influenzae, Staphylococcus aureus, bacilos gramnegativos (BGN) excluyendo *H. influenzae, M. pneumoniae y Clamydia pneumoniae* son los agentes que siguen en frecuencia como agentes etiológicos.

Mycobacterium tuberculosis es agente causal de NAC y debe ser considerado en todo paciente que consulta por síntomas respiratorios que se extienden por más de 2 semanas o que no hayan respondido a terapéutica antibiótica adecuada.

En los últimos años, su incidencia aumentó y está estrechamente asociada con infección del virus VIH/SIDA y por otros factores relacionados con la pobreza.

El diagnóstico oportuno de TBC (tuberculosis) posibilita el tratamiento y control epidemiológico de esta infección.

Etiología de NAC que recibe tratamiento ambulatorio

Agentes predominantes: *Streptococcus pneumoniae, C. pneumoniae, M. pneumoniae* y virus.

En pacientes mayores de 65 años y fumadores se debe agregar a esta lista *H. influenzae.*

Un estudio realizado en 184 pacientes con NAC de manejo ambulatorio se estimó que *S. pneumoniae* es responsable del 20% de las neumonías, seguido en frecuencia por *C. pneumoniae* 13%, virus respiratorio 10,5%, *H.influenzae* 1,8 % y de etiología mixta 18%.

Estos hallazgos en nuestro país se estiman que tienen similar distribución.

Etiología en pacientes internados en sala general

Predomina *Streptococcus pneumoniae* 20-60 % seguido por *H. influenzae*, *C. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y BGN, *Legionella* spp.*,* (en Argentina los casos diagnosticado de Legionella no son autóctonos) y *M. tuberculosis* aportan 10% cada uno de estos agentes (*)

Etiología en pacientes internados en UTI

Agentes predominantes: *S. pneumoniae*, BGN, *H influenzae*, *S. aureus, C. pneumoniae* y en pocos casos *Pseudomona aeruginosa*

En pacientes jóvenes con neumonía severa se debe considerar la asociación con VIH/SIDA y neumonía por *Leptospira* spp. y *Hanta virus*

Relación entre agente etiológico y condiciones epidemiológicas

H. influenzae: > 65 años y tabaquismo y enfermedades comorbidas.
BGN: internación en geriátricos, uso reciente de antibiótico, enfermedad cardiopulmonar.

Pseudomona aeruginosa: fibrosis quistica, bronquiectasias, uso de corticoides (10 mg/día), internación en UTI (en el último mes), uso previo de antibiótico de amplio espectro (> de 7 días en el último mes) y presencia de enfermedades comorbidas en especial neoplasias onco-hematológicas.

S.aureus diabetes, alcoholismo, insuficiencia renal e infecciones virales previas.

Mycobacterium tuberculosis: infección VIH/SIDA, alcoholismo, desnutrición, hemodiálisis, contacto con pacientes con TBC, residencia en geriátrico y drogadicción.

Agentes etiológicos de neumonía adquirida en la comunidad

	EEUU	Argentina
Streptococcus pneumoniae	60-80%	50-72%
Haemophylus influenzae	3-15%	18%
Staphylococcus aureus	2-5%	13%
Bacilos gram negativo excluyendo *H. influenzae*	7-18%	
Micoplasma pneumoniae	8-12%	
Mycobacterium tuberculosis	3%	

Tratamiento

Al iniciar tratamiento se deben realizar las siguientes consideraciones: agentes etiológicos más frecuentes, condiciones epidemiológicas, severi-

dad de la infección, factores pronósticos, estado inmunológico del paciente y elección del lugar de tratamiento (ambulatorio, sala general o UTI).

Factores pronósticos de morbimortalidad

(Los factores de pronóstico, permiten estimar el riesgo de mortalidad) y por lo tanto facilita la identificación de pacientes con bajo riesgo de mortalidad, estos pacientes pueden ser tratados en consultorio externo y los de alto riesgo deben ser internados.

En nuestro país se sugiere el uso de Guía de NAC elaborada por un Comité de Ínter sociedades: Asociación de Medicina Respiratoria (AAMR), Sociedad Argentina de Infectologia (SADI), Sociedad Argentina de Bacteriología Clínica (SADEBAC), Asociación Argentina de Microbiología (AAM), Sociedad Argentina de Virologia (SAV), Sociedad Argentina de Medicina (SAM) Buenos Aires

- Modificadores: Edad > 65, alcoholismo, insuficiencia renal, hepatopatía, enfermedad cerebrovascular, neoplasia, enfermedad pulmonar crónica, diabetes, insuficiencia cardiaca, internación el año anterior por NAC.
- Radiografía sugestiva de mal curso evolutivo: derrame pleural voluminoso o tabicado, cavitación, infiltrados multilobulares o aumento > 50% en 24 hs;
- Repercusión en examen físico: taquipnea > 30/min., TAS < 90 o TAD < 60 mm Hg, taquicardia > 125/ min., temperatura >40° ó < 35°, confusión mental; Laboratorio relacionado a mal curso evolutivo: urea > 50 mg %, Hto < 30%, Na < 130 mEq/l, leucocitos < 3 000 o > 40 000/ mm3, glucemia > 250 mg %, pH < 7.35, PaO2 < 60 mmHg.

El mejor tratamiento antibiótico es aquel que cura permitiendo la rápida restitución social, induce mínimas reacciones adversas y presenta costos ecológicos y financieros óptimos.

Se debe ser eficiente en la utilización de los recursos más aún en países en desarrollo y/o con crisis económica y social.

Grupo I. pacientes ambulatorio: NAC en pacientes ambulatorio

Amoxicilina si bien no cubre los microorganismos intracelulares es aceptable su indicación en pacientes jóvenes y libres de enfermedades comorbidas ya que en este grupo etario un eventual tratamiento inapropiado sin respuesta a las 72 hs puede corregirse sin mayores riesgos.

Macrólidos y doxiciclina cubren la mayoría de los agentes etiológicos de neumonía y son una indicación alternativa de inicio.

- Los pacientes >65 años y fumadores y/o con enfermedades subyacentes (EPOC, insuficiencia cardiaca, insuficiencia respiratoria, alcoholismo, diabetes, insuficiencia renal crónica pueden tener infecciones por *H. influenzae* (potencial elaborador de ß- lactamasa), *S. aureus*, eventualmente BGN por lo cual el antimicrobiano debe ser elegido teniendo presente estas consideraciones y agentes etiológicos.

Grupo II: Internación en sala general

Estos pacientes tienen indicación de internación en sala general por la potencialidad de presentar complicaciones. Los patógenos por cubrir son *S pneumoniae, H. influenzae*, virus respiratorios, *C. pneumoniae*, *S. aureus* y BGNA(bacilos gramnegativos aerobios). Por lo cual se debe emplear en este grupo una aminopenicilina más inihibidor de β-lactamasa y en algunas situaciones una cefalosporina de 3ra generación. La cobertura de bacterias atípicas sigue siendo controvertida.

Grupo III NAC internado en UTI

En estos pacientes los motivos más frecuentes de internación son insuficiencia respiratoria, soporte cardiovascular por lo cual tienen alta mortalidad, los microorganismos agentes etiológicos son similares a los del grupo II con una mayor incidencia de infecciones mixtas y bacilos gramnegativos incluyendo *Pseudomona aeruginosa.*

La combinación de aminopenicilina mas inhibidor de ß-lactamasa-ceftriaxona, cefotaxima en asociación con macrólido o flouroquinolona brindan una adecuada cobertura para la mayoría de los casos.

El paciente que presente factores de riesgo para infección por *Pseudomona aeruginosa* deberá tratarse con dos antimicrobianos activos contra este agente, además de dar cobertura a los otros patógenos potenciales.

Neumonía espirativa: se sugiere el uso de ampicilina más sulbactam, la clindamicina debe considerarse una alternativa aceptable.

Si hay riesgo de infección mixta se sugiere utilizar una combinación de antimicrobianos activos contra estos microorganismos (ciprofloxacina o cefalosporina de 3ra generación con un anti anaeróbico (metronidazol o clindamicina).

Duración del tratamiento

No existen evidencias de peso para hacer una recomendación acerca de la duración del tratamiento.

El objetivo del tratamiento es eliminar el patógeno etiológico de la NAC y esto probablemente se logre en 3 días al menos para *S.pneumoniae*.

Las mejorías clínicas y radiológicas tardan varios días más porque dependen de factores fisiopatológicos desencadenados por la infección.

Neumonía leve a moderada 7 días.

Neumonía severa, pacientes internados 10-14 días. No se justifica prolongar más allá de este tiempo.

En pacientes internados es posible cambiar el antimicrobiano administrado por vía parenteral a la vía oral una vez que el paciente presente evidencias de mejoría clínica y esto ocurren dentro de las primeras 72 h de iniciado el tratamiento adecuado.

El desvio hacia la terapia oral pude ser secuencial cuando en el pasaje se utiliza la misma droga con niveles séricos equivalentes o similar biodisponibilidad.

Se debe evaluar determinados criterios para realizar el desvió hacia la vía oral.

- Mejoría de la tos y taquipnea
- Resolución de fiebre durante 8-24 horas
- Tracto gastrointestinal permeable

Los agentes antimicrobianos deben reunir determinadas características para ser aptos para la terapia, incluyendo buena absorción, adecuado nivel en sangre y posología adecuada.

Otro factor que se debe considerar es que el paciente esté apto para recibir tratamiento por vía oral.

El pasaje del tratamiento antimicrobiano de la vía parenteral a la vía oral no necesariamente significa que esté apto para el alta hospitalaria precoz, los pacientes que presenten comorbilidades o aquellos que requieren la realización de estudios fibrobroncoscópicos, generalmente requieren un control clínico más estrecho que está garantizado con la prolongación de la internación.

Esquemas recomendados de tratamiento empírico inicial en NAC

- **Grupo 1**: Pacientes ambulatorios*

a. Menores de 65 años sin comorbilidades

- Patógenos blancos: *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*

Antibiótico	Dosis y vía de administración
Tratamiento sugerido	Amoxicilina 1 gr c/8-12 hs – Oral
Alternativas y alérgicos	Eritromicina 500 mg c/6 hs – Oral
	Claritromicina 500 mg c/12 hs - Oral
	Doxiciclina 100 mg c/12 hs - Oral

b. Con comorbilidades y/o mayores de 65 años

- Patógenos blancos: *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *S. aureus* y (BGNA)

Antibiótico	Dosis y vía de administración
Tratamiento sugerido	Amoxicilina/clavulanato 875/125 mg c/8-12 hs -Oral
Alternativas y alérgicos	Levofloxacina 500 mg c/24 h Oral
	Moxifloxacina 400 mg c/24 h Oral

- **Grupo 2**: Pacientes que requieren internación en sala general

a. Menores de 65 años, sin comorbilidades y con fuerte sospecha de etiología neumocóccica.

- Patógeno blanco: *S. pneumoniae.*

Antibiótico	Dosis y vía de administración
Tratamiento sugerido	Ampicilina 1 g c/6 h IV
Alternativas y alérgicos	Claritromicina 500 mg c/12 h IV
	Clindamicina 600 mg c/8 h IV

b. Con comorbilidades y/o mayores de 65 años

- Patógenos blancos: *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *S. aureus*, BGNA, *L. pneumophila.*

Tratamiento sugerido	Ampicilina/sulbactam, o 1.5 g c/8 h IV
	Claritromicina o 500 mg c/12 h iv
Alternativa	Ceftriaxona 2g día

* Si el paciente está internado por motivos sociales, el tratamiento que debe recibir es el que corresponde a pacientes ambulatorios

- **Grupo 3**: Pacientes con NAC grave que requieren internación en UTI

a. Sin factores de riesgo para P. aeruginosa

- Patógenos blanco: *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *S. aureus*, BGNA, *L. pneumophila*.

Antibióticos	Dosis y vía de administración
Tratamiento sugerido	Ampicilina/sulbactam, o 1.5 g c/8 h IV
Alternativa	Ceftriaxona, o 1-2 gr c/24 h IV
Alérgicos	Levofloxacina 750 mg c/24 h IV
	Clindamicina 600 mg c/8 h IV

- **Grupo 3**: Pacientes con NAC grave que requieren internación en UTI

b. Con factores de riesgo para P. aeruginosa

- Patógenos blancos: *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *S. aureus*, BGNA.

Antibióticos	Dosis y vía de administración	Comentarios
Tratamiento sugerido	Cefepime 2 g c/12 h IV 0 Piperacilina/tazobactam 4,5 g cada 8 h IV + Ciprofloxacina 400 mg c/8 h IV.	

Alternativas	Cefepime, 2 g c/12 h I o Piperacilina/tazobactam 4,5 g c/8 hs – IV + Amikacina 15 mg/kg/día (dosis única/ día) IV
Alérgicos	Aztreonam 2 g c/8 hs – IV + Amikacina 15 mg/kg/día (en una dosis única diaria) – IV

Neumonías que no responden al tratamiento

La neumonía que no responde se define por la persistencia del infiltrado, acompañado de los signos y síntomas respiratorios.

La falta de respuesta puede ser temprana o tardía:

- Falta de respuesta temprana: no hay evidencia de mejoría clínica luego de 72 horas de iniciado el tratamiento.
- Falta de respuesta tardía: inadecuada resolución radiológica luego de 40 días.

Frente a neumonía con falla temprana se debe considerar las siguientes hipótesis

- ¿El diagnóstico de neumonía es correcto?
- ¿El tratamiento instituido es el adecuado?
- ¿Estamos frente a un microorganismo inusual o resistente al tratamiento instituido?
- ¿Estamos frente a una neumonía complicada (atelectasia, derrame pleural, cavitaciones o formación de absceso)?

La resolución lenta está básicamente relacionada con las alteraciones de los mecanismos defensivos del huésped: pacientes inmunocomprometidos, presencia de cuerpo extraño y presencia de cáncer.

La evolución de la neumonía por lo tanto está vinculada a factores del huésped y características de virulencia del agente infectante.

Es habitual que los pacientes con neumonía presenten mejoría luego de 72 h de incorporado el tratamiento antimicrobiano.

Si el paciente presenta buena evolución clínica no se justifica solicitar Rx. de tórax porque la resolución radiológica puede tardar 4 semanas.

En todo paciente que persiste con evolución tórpida luego de 4 semanas se debe solicitar una nueva Rx. de tórax o bien una TAC de tórax con el objetivo de evaluar la causa que justifique la no respuesta apropiada.

Tratamiento inapropiado: puede deberse a error en la administración del antimicrobiano (dosis sub-terapéutica e interacciones con otras drogas) o no adherencia del paciente, elección inapropiada del tratamiento, microorganismos resistentes o no habituales.

Inmunoprevención

Vacuna antigripal está recomendada:

- En mayores de 6 meses que por edad, o enfermedad subyacente tengan un riesgo incrementado de complicaciones.
- Personal de salud y sus convivientes.
- Pacientes mayores de 55 años.
- Pacientes con enfermedades subyacentes: EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), Insuficiencia cardiaca, insuficiencia renal, diabetes, hepatopatias crónicas, inmunosuprimidos, pacientes con infección VIH/SIDA con CD4> 200 cel/ml, embarazadas en época invernal.
- Toda persona que solicite la inmunización.

Efectividad de la vacuna:

- Reduce la incidencia de enfermedades respiratoria.
- Reduce la hospitalización.
- Reduce la mortalidad vinculada a la gripe, en personas con riesgo incrementado.
- Es efectiva en 40- 70 % en pacientes ancianos no institucionalizado para prevenir complicaciones secundarias.
- Es efectiva para prevenir neumonía en 60% y la muerte en 80% en pacientes internados en geriátricos.
- Previene la gripe en 70-90% de personas sanas menores de 65 años por lo cual disminuye el riesgo de neumonía bacteriana aguda pos influenza.

Vacuna anti-neumocóccica. Indicaciones en adultos (Recientemente se modificó el esquema de inmunización antineumococcica)

La inmunización contra neumococo en adultos es una estrategia que tiene el objetivo de disminuir las complicaciones y la mortalidad de la infección por *S. pneumoniae* en la población adulta.

Las vacunas actualmente disponibles son: vacuna polisacárida de 23 serotipos (VPN23) y la vacuna conjugada de 13 serotipos (VCN13).

Luego de una revisión de la evidencia científica disponible, la carga de enfermedad y la distribución de serotipos de neumococo en los adultos en Argentina, la Comisión Nacional de Inmunización recomendó la siguiente estrategia de vacunación en adultos:

- Personas mayores de 18 años que presenten una o más de las siguientes comorbilidades:
  * Inmunodeficiencias congénitas o adquiridas,
  * Infección por VIH, insuficiencia renal crónica, síndrome nefrótico
  * Leucemia, linfoma y enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple enfermedades neoplásicas.
  * inmunodepresión farmacológica, trasplante de órgano sólido, asplenia funcional o anatómica y anemia de células falciformes.
  * Implante coclear y fístula de LCR.

  1 dosis de VCN13 seguida de 1 dosis de VPN23 con un intervalo mayor a 8 semanas. A los 5 años 1 dosis de refuerzo de VPN23 y otra dosis deVPN23 a los 65 años (si la dosis previa fue administrada antes de los 60 años y dejando un intervalo mayor a 5 años con la dosis anterior)

- Personas mayores de 18 años que presenten una o más de las siguientes condiciones:
  * Cardiopatía crónica, enfermedad pulmonar crónica, diabetes mellitus,
  * Alcoholismo, enfermedad hepática crónica, tabaquismo

  Entre 18 y 64 años: VPN23 1 dosis. Repetir VPN23 al cumplir 65 años (dejando un intervalo mayor a 5 años con la dosis anterior).

  Mayores de 65 años: VPN23 1 dosis. Si se trata de una esplenectomía programada, debe administrarse la vacuna 2 semanas antes de la misma.

Personas mayores de 65 años sin comorbilidades: VPN 23: 1 dosis
Trasplante de células hematopoyéticas: VCN13: 3 dosis. Iniciar la vacunación luego de 6 meses del trasplante. A los 12 meses de la última dosis de VCN13 administrar 1 dosis de VPN23.

Reemplazar esta por VCN13 si hubiera Enfermedad Injerto Contra Huésped (EICH) Otras consideraciones importantes:

En las personas que tuvieran indicación de VCN13 y hubieran recibido previamente una o más dosis de VPN23, deberá asegurarse un intervalo mayor a 12 meses entre la última dosis de VPN23 y el inicio del esquema con VCN13. En el caso de personas mayores de 65 años no se requerirá orden médica. La misma solo se solicitará en el caso de personas entre 18 y 64 años y deberá especificar el motivo de la indicación de la vacunación de acuerdo a los grupos descriptos previamente.

Con respecto al uso de VCN13 en otros grupos de edad o con comorbilidades, se aguarda la evaluación del impacto de la protección de rebaño en los adultos resultante de la vacunación en niños y la publicación de estudios de eficacia en mayores de 65 años para definir su incorporación a las recomendaciones.

Tuberculosis tratamiento

El tratamiento de la tuberculosis se basa en la utilización de drogas antituberculicidas utilizadas, en formas combinadas.

Actualmente disponemos de 10 drogas aprobadas por la Administración de Drogas y alimentos (FDA)

Las drogas consideradas de elección para el tratamiento de tuberculosis sensible son:

- Isoniazida (INH)
- Rifampicina (RIF)
- Etambuto (EMB)
- Pirazinamida (PZA)

> Esquema de elección

Fase inicial: INH, RIF, PZA y EMB diarios por 8 semanas
Fase de consolidación: INH y RIF diariamente por 18 semanas.

Esquema alternativo: tratamiento administrado en forma supervisada

Fase inicial: INH, RIF, PZA y EMB* 3 veces por semana por 8 semanas.

> Tratamiento para tuberculosis resistente a los medicamentos

Se denomina tuberculosis resistente a la infección por *Mycobacterium tuberculosis* resistente a por lo menos un fármaco antituberculoso de primera línea.

Se denomina tuberculosis multirresistente (TB MR) a la infección por *Mycobacterium tuberculosis* resistente a más de un fármaco antituberculoso y por lo menos a la isoniazida (INH) y rifampicina (RIF).

La tuberculosis resistente acarrea complicaciones para el tratamiento adecuado y con el objetivo de cura clínica y microbiológica

La administración inadecuada de medicamentos puede poner en peligro la vida del paciente por toxicidad

La tuberculosis resistente a los medicamentos debe ser tratada bajo la supervisión cercana de un experto en la enfermedad.

En paciente con TBMR se utilizan combinaciones de ciprofloxacina, capreomicina, pirazinamida, etambutol y mácrolidos por tiempo prolongado.

El laboratorio ■ margarita laczeski

El aporte del laboratorio de bacteriología al diagnóstico de las infecciones bacterianas y en particular de las que afectan a las vías respiratorias, sigue siendo crucial y es irremplazable en diferentes aspectos como la identificación de las bacterias involucradas, la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos, y fundamentalmente la interpretación de los resultados obtenidos como única forma de aportar a las conductas médicas a seguir.

En los últimos años se han desarrollo técnicas de biología molecular que permiten identificar con elevada especificidad y sensibilidad los agentes etiológicos en corto tiempo. Dichas técnicas se utilizan en carácter de complementarias y confirmatorias tanto para estudio de microorganismos atípicos o no cultivables en medios convencionales, investigación de brotes, detección y confirmación molecular de mecanismos de resistencia a antimicrobianos.

Las técnicas moleculares mencionadas, sin embargo, no reemplazan al cultivo por métodos convencionales o automatizados, que sigue siendo la técnica de oro en bacteriología porque permiten aislar al microorganismo y determinar su perfil de sensibilidad para implementar el tratamiento antimicrobiano adecuado.

Las muestras clínicas que llegan al laboratorio, para el diagnóstico bacteriológico de las infecciones de las vías respiratorias, son diversas, y dependen de la zona de sospecha de localización de la infección.

Es imprescindible, para lograr un diagnóstico certero, contar con una correcta anamnesis del paciente e identificar la naturaleza de la infección (de la comunidad o intrahospitalaria).

El criterio y el valor clínico de los ensayos realizados que el bacteriólogo efectúa sobre la muestra clínica y sobre el microorganismo aislado dependen de un correcto diagnóstico inicial, de la calidad de la muestra, del tipo de pruebas realizadas sobre la misma y de la metodología empleada.

La muestra debe ser representativa del sitio de localización de la infección, correctamente transportada y conservada hasta su procesamiento en el laboratorio, para lograr resultados óptimos.

El estudio bacteriológico de las muestras carece de valor si no se realiza un enfoque hacia los diferentes patógenos que puedan estar involucrados.

En la investigación de patógenos implicados en las infecciones de las vías respiratorias superiores, tendremos muestras de garganta, nasofaringe, oído medio, senos paranasales y abscesos del espacio retrofaríngeo y para las vías respiratorias inferiores, material de tráquea, bronquios, pulmones, pleura e incluso hemocultivos.

Para cada caso existen pruebas de laboratorio obligatorias y alternativas o complementarias que serán expuestas oportunamente.

Resulta necesario enfatizar que realizar un diagnóstico responsable implica la investigación de los microorganismos conforme a los recursos disponibles en cada laboratorio y su derivación a centros de mayor complejidad cuando se superen los mismos. El conocimiento de los alcances y limitaciones de cada servicio obliga a la actualización permanente de sus profesionales.

Recordar que el bacteriólogo debe estar capacitado siempre para responder a las siguientes preguntas y todas dependen de su formación y su criterio profesional a partir de los saberes previos, adquiridos por experiencia y capacitación:

1. datos epidemiológicos de interés relacionados al paciente.
2. qué muestra procesar y su obtención.
3. cómo y dónde la conservo hasta su procesamiento.
4. cuál es el/los supuesto/s agente/s etiológico/s.
5. cómo estudio microbiológicamente.
6. cómo interpreto los resultados obtenidos
7. qué informo- cómo informo y cuándo informo.

Infecciones de las vías respiratorias altas (IVR altas)

Las infecciones de las vías respiratorias altas incluyen la faringoamigdalitis, sinusitis, otitis, laringitis, laringotraqueitis y epiglotitis. Las tres últimas presentaciones generalmente son de etiología viral.

Otitis Media

Para orientar su diagnóstico es necesario tener presente que es una de las patologías más frecuentes en niños y se define como la presencia de exudado en la cavidad media del oído.

El diagnóstico de la otitis media se realiza de acuerdo a síntomas clínicos y signos obtenidos con otoscopía de luz y la neumatoscopía.

La otitis media se divide en:

1. Otitis media con efusión (OME) sin síntomas acompañantes, que se divide a su vez en OME subaguda (secreción persistente entre 2 semanas y menor a 3 meses) y OME crónica (secreción mayor a 3 meses), conocida en nuestro país como otitis media crónica supurada (OMCS).
2. Otitis media aguda (OMA) definida con presencia de exudado acompañado de otalgia y/o fiebre. Síntomas que pueden estar presentes o no y complican la diferenciación de las diferentes presentaciones de la enfermedad.

La distinción entre ambas patologías, muchas veces, es difícil de establecer y deben considerarse como estadios diferentes de la misma patología.

Otitis Media Aguda (OMA)

Puede presentarse en forma exudativa (con derrame) acompañada o no, de perforación timpánica.

La única muestra VÁLIDA, para el estudio microbiológico de la OMA, es la punción del contenido del oído medio por timpanocentesis (en caso de tímpano íntegro).

La punción con aspiración no es indispensable y prefiere evitarse, por la naturaleza invasiva del proceso, en el huésped inmunocompetente debido a que la etiología puede predecirse en la mayoría de los casos.

La timpanocentesis está indicada en forma absoluta cuando se confirma la presencia de exudado retenido en cavidades del oído medio y en las siguientes situaciones:

- Huésped inmunocomprometido.
- Recién nacido séptico.
- Otitis media con exudado en pacientes con síndrome meníngeo.
- Otitis media aguda complicada (por ej: parálisis facial, mastoiditis, etc.).

La timpanocentesis está indicada en forma relativa en:

- Otalgia persistente que no cede con la medicación

Se debe enviar siempre la muestra para cultivo, la que puede llegar en la misma jeringa y aguja con la que se tomó la muestra (previa eliminación del aire retenido y obturado con tapón de goma o caucho), en tubo seco estéril o en recipiente comercial apropiado con atmósfera anaeróbica. De acuerdo a las normas de bioseguridad vigentes sólo el último método es confiable.

El material debe ser extraído en forma estéril por el otorrinolaringólogo.

Esto implica, que debe RECHAZARSE la toma con hisopo de la secreción purulenta proveniente de oído medio.

La etiología es diversa y multifactorial. En adultos, como en niños, se recuperan con mayor frecuencia: *Streptococcus pneumoniae* (el más frecuente, el que más persiste en la cavidad del oído medio y el que con mayor frecuencia presenta resistencia al tratamiento)*, Haemophilus influenzae* no tipificables y *Moraxella catarrhalis.*

Otros microorganismos involucrados con menor frecuencia son: *Streptococcus* pyogenes grupo A (SGA), *Staphylococcus aureus* y bacilos gramnegativos.

En el caso de aislar *Candida* spp., es conflictivo atribuirle rol etiológico.

Otitis Media Crónica Supurada (OMCS)

Es otra de las enfermedades del oído medio, frecuentes en pediatría. Se la define como la infección del oído y mastoides, con otorrea a través de la membrana timpánica **no intacta (perforada)**, que persiste más de 2 a 3 meses.

La única muestra válida, para el estudio microbiológico de la Otitis Media Crónica (OMC) es la aspiración del contenido del oído medio.

Después de la perforación de la membrana del tímpano, el material debe ser extraído a través de la perforación timpánica por aspiración del exudado.

La obtención debe realizarse posterior a la limpieza y desinfección (alcohol 70%) del conducto auditivo externo con aguja.

La toma de muestra de la otorrea por hisopado auditivo externo no es adecuada.

Los microorganismos involucrados en esta patología difieren de los que producen OMA.

Los más frecuentes son *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Para algunos autores, también los anaerobios (en especial *Bacteroides melaninogenicus*) cumplirían un rol relevante.

Tener en cuenta que *Pseudomonas* por lo general, no da respuesta inflamatoria.

Esta presentación de la infección del oído medio junto a la OMA son las únicas que deberían recibir tratamiento antimicrobiano.

Otitis Externa

Infección del conducto auditivo externo, que puede presentarse en forma localizada, difusa, crónica o maligna.

Las muestras válidas para el diagnóstico son las obtenidas por: punción de absceso (si lo hubiera) o timpanocentesis.

Entre los agentes etiológicos se encuentran: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* spp., anaerobios y *Pseudomonas aeruginosa*.

También pueden estar implicados: *Escherichia coli*, *Proteu*s spp., Cándida spp., y *Aspergillus* spp.

En el paciente inmunocomprometido, la otitis externa maligna es una celulitis del conducto auditivo externo, aislándose generalmente *Pseudomonas aeruginosa*.

En este caso, la toma de la muestra se realiza con hisopo, el que se coloca en un tubo tapa a rosca con 1 ml de solución fisiológica. Realizar siempre en paralelo, la extracción de hemocultivos seriados.

> Procesamiento de muestras de punción de oído medio

Es importante que las muestras obtenidas por timpanocentesis (tímpano íntegro) o por aspiración del exudado del oído medio (si hay perforación), se procesen y cultiven de inmediato.

> Realizar

- Coloración de Gram: Informar respuesta inflamatoria, reacción tintorial y descripción morfológica (forma y disposición) de los microorganismos.
- Siembra: Los medios de cultivo a utilizar, dependen de la sospecha clínica y lo observado en la coloración de Gram. Por lo general se utilizan: agar sangre, agar chocolate y un agar lactosado (Ejemplo: Agar Eosina Azul de Metileno Levine: EMB Levine) en especial, cuando la muestra proviene de un neonato, donde la probabilidad de detectar bacilos gramnegativos es mayor. Adicionar un medio líquido como caldo tioglicolato o caldo cerebro corazón.
- Incubación de las placas:
  a. Agar sangre y agar chocolate: a 35ºC por 48 a 72 horas, en atmósfera reducida en oxígeno – 5 a 10% de CO2 (método alternativo: recipiente con vela y algodón humedecido con agua).
  b. Agar lactosado: a 35ºC por 48 a 72 horas, en aerobiosis.
  c. Medios líquidos: a 35ºC, incubar 5 a 7 días, con subcultivos a ciegas a las 24 hs.

La siembra se realiza con técnica para aislamiento cuyo procedimiento se visualiza claramente en la Figura 1.

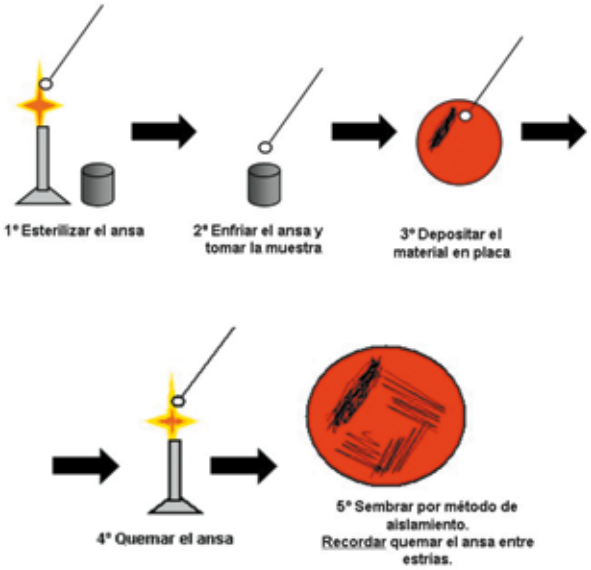


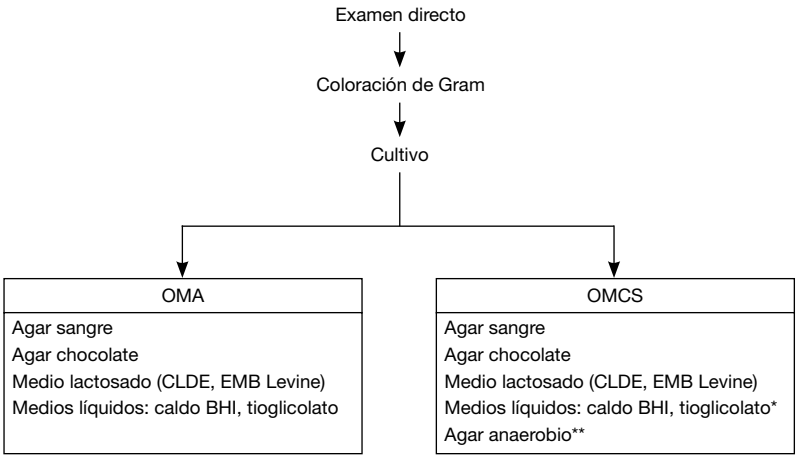
Figura 1. Esquema de técnica de siembra para aislamiento.

Para el estudio de microorganismos anaerobios, se deben agregar medios indicados para su aislamiento, como agar sangre con vitamina K y caldo sellado con parafina.

En el caso de pacientes VIH (+), incorporar a la marcha medios para cultivo micológico, como agar Sabouraud.

En caso de otitis bilateral, se debe cultivar el material de ambos oídos, ya que sólo en el 64% de los casos se tendrá el mismo microorganismo, según la bibliografía disponible.

- Identificación: De acuerdo a las colonias obtenidas en el cultivo y la reacción tintorial observada en frotis realizados con las mismas, se deberán realizar las pruebas bioquímicas y/o serológicas correspondientes a fin de identificar el agente etiológico. Para ello, se debe recurrir a manuales o tablas de identificación bacteriana.
- Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos: Según el microorganismo aislado, la sensibilidad puede determinarse por difusión o por dilución, según corresponda y de acuerdo a la metodología y criterios de interpretación ya expuestos en (**Capitulo 9**).



Flujograma 1. Procesamiento de muestras de punción de oído medio.

Sinusitis Aguda

Tanto en adultos como en niños, los cultivos obtenidos de las narinas, del vestíbulo nasal o nasofaringe, no tienen correlación con la sinusitis.

En casos agudos la muestra válida es la punción sinusal, realizada por el otorrinolaringólogo con dos fines, diagnóstico y terapéutico.

En los casos en que se sospeche una micosis, se deben estudiar muestras del seno afectado, obtenidas por vía endoscópica o a cielo abierto.

La punción sinusal es un procedimiento que no se realiza de rutina, estando indicada en:

a. Huésped inmunocomprometido.
b. Fallo terapéutico (según gravedad de la presentación).
c. Complicaciones crónicas.
d. Dolor facial intenso.
e. Complicaciones orbitarias o intracraneales.

Los agentes etiológicos involucrados en la fase aguda de la sinusitis son semejantes a los observados en OMA: *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae* no tipable y *Moraxella catarrhalis*.

También pueden aparecer *Streptococcus pyogenes*, estreptococos del grupo C, estreptococos del grupo viridans, estafilococos (*S. aureus* y *S. epidermidis*) y *Eikenella corrodens*.

En forma semejante a lo que ocurre en OMCS, en la sinusitis crónica o de origen odontogénico, aumenta la incidencia de bacterias anaerobias: *Peptostreptococcus* spp., *Prevotella* spp., y *Propionibacterium acnes* (de dudoso significado clínico) y bacilos gramnegativos.

La población anaeróbica es de frecuente hallazgo cuando existe un foco bucal.

En inmunocomprometidos hay que considerar la posibilidad de hongos filamentosos y mucorales.

En personas con fibrosis quística, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* pasan a ser los agentes etiológicos más frecuentes.

Los cultivos obtenidos por punción de los senos maxilares, deben ser cuantitativos, ya que recuentos mayores a 10^4 UFC/ml permiten diferenciar infección de colonización.

Los medios de cultivo a utilizar dependen de la sospecha clínica y lo observado en la coloración de Gram.

El procesamiento de la muestra es similar al indicado en muestras de OMA.

Faringitis o faringoamigdalitis

El 70 – 80% de las faringitis son de etiología viral, por lo que el laboratorio de bacteriología puede contribuir poco al aislamiento y caracterización del agente causal y mucho en el sentido de descartar el origen bacteriano de la infección.

Las de etiología bacteriana ocurren en todas las edades, pero prevalece la producida por *Streptococcus pyogenes* (más del 85%) en niños de edad escolar con edades comprendidas entre los tres y once años de edad.

En adolescentes y adultos jóvenes *Arcanobacterium haemolyticum* produce algunos casos de faringitis asociada a exantema escarlatiniforme.

Son agentes menos frecuentes: *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, estreptococo beta hemolítico del grupo C, estreptococo beta hemolítico del grupo G y *Corynebacterium diphtheriae*.

En aproximadamente un 30% de las faringitis agudas, no es posible identificar al agente etiológico del proceso infeccioso.

El método de elección en el diagnóstico, sigue siendo el cultivo de **hisopado de fauces**, contrariamente a lo descrito anteriormente en esta guía para otras patologías del tracto respiratorio superior, donde el hisopado debe rechazarse.

La solicitud de hisopado de fauces, por parte del médico tratante, lleva implícito sólo la búsqueda de SGA, investigar la presencia de otros microorganismos, será necesario y está indicado únicamente cuando se sospechan situaciones especiales como: faringitis gonocócica, faringitis fusoespirilar en inmunocomprometidos y confirmación epidemiológica de tóxico-infección por *Corynebacterium diphtheriae*.

Otros microorganismos como: *Haemophilus influenzae*, estafilococos, neumococos u otros cocos grampositivos, no se asocian a infección, por lo que en general, no deben ser considerados clínicamente.

Los métodos rápidos de detección de antígenos han cobrado, en los últimos años, un rol relevante por su alta sensibilidad, sencillez y rapidez de la técnica, permitiendo reducir y racionalizar los tratamientos antimicrobianos.

El estudio bacteriano de las faringoamigdalitis, debe enfocarse entonces a la búsqueda de SGA. Desde el punto de vista clínico, el diagnóstico diferencial de la faringitis estreptocócica de otras formas de faringitis, es difícil o imposible, por lo que siempre se recomienda el cultivo o test rápidos disponibles.

El cultivo para búsqueda de SGA, SGC, SGG es una prueba de laboratorio obligatoria en el estudio bacteriano de la faringoamigdalitis.

El test rápido para detección de antígenos de SGA, y cultivo e identificación de Corynebacterium diphtheriae bajo solicitud específica, son pruebas optativas.

Toma de muestra: La obtención de las secreciones, se realiza con escobillones o hisopos estériles a nivel de las lesiones, frecuentemente de ambas amígdalas y faringe. Para lograr la máxima sensibilidad debe frotarse la zona y evitar la contaminación con saliva y zonas anteriores de la boca.

La muestra debe tomarse antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano (difícilmente se detecten los estreptococos A, C o G por cultivo luego de 18 a 24 horas de iniciado el tratamiento).

Se deben utilizar dos hisopos: uno para cultivo y otro para detección directa de antígenos cuando el laboratorio disponga de esta técnica.

Si existe exudado, deberá recogerse; si existen falsas membranas, se extraerá el material de su periferia.

Técnica de obtención: Con ayuda de un baja lengua, mantener baja la lengua del paciente y la garganta bien expuesta e iluminada, frotar enérgicamente con el hisopo la parte posterior de la misma, las amígdalas y toda parte donde haya inflamación exudado o ulceración.

Tener cuidado de no tocar con el hisopo labios y lengua.

El hisopo debe colocarse en un tubo seco estéril. Los estreptococos buscados resisten a la desecación por lo que la muestra puede dejarse a temperatura ambiente durante 24 hs, aunque esto implica pérdida de rendimiento y la recomendación general para cualquier muestra clínica, es siempre sembrar inmediatamente.

También es recomendable luego de 24 hs de obtención de la muestra colocar el hisopo en medio de transporte Stuart o dejarse a temperatura ambiente sin el agregado de ningún conservante.

En la faringitis por *Streptococcus pyogenes*:

Recordar que:

a. En niños menores de 3 (tres) años, son escasas las posibilidades de aislarlos, debido a que la faringitis generalmente es de etiología viral.
b. No hay relación entre la clínica y la cantidad de colonias de los estreptococos aislados (tampoco interesa la estría donde desarrollen), lo importante es su presencia o no, en el desarrollo de los cultivos.
c. Se debe investigar también: *Streptococcus* grupo C y grupo G.

> Diagnóstico

A. Directo - Rápido

La técnica de detección rápida se utiliza porque si bien el cultivo es la técnica de oro, los resultados se obtienen a las 24 – 48 hs, lo que retrasa la iniciación del tratamiento. Estos test permiten resultados en 30 – 60 minutos.

Se basan en la detección del carbohidrato de SGA, obtenido por métodos químicos o enzimáticos, directamente del hisopado faríngeo.

Actualmente se dispone de cuatro métodos de detección: aglutinación de partículas de látex recubiertas del carbohidrato del grupo A, ELISA, ELISA modificado e inmunoensayo óptico.

Tienen un alto valor predictivo positivo (sensibilidad baja y variable, menor a 90% y especificidad cercana al 100%), por lo que ante un resultado negativo, la muestra debe ser cultivada en agar sangre.

Pueden aparecer reacciones cruzadas con *Streptococcus milleri* grupo A.

B. Coloración de Gram

No se realiza el examen por coloraciones o fresco de la muestra, en el diagnóstico de las faringoamigdalitis bacterianas clásicas, debido a que, los agentes causales no se diferencian morfológica ni tintorialmente de la población bacteriana habitual de orofaringe, a excepción de la Angina de Vincent, donde la coloración de Gram es de importancia en el diagnóstico.

C. Cultivo

Debido a que se investigan microorganismos beta-hemolíticos, se siembra en placas de agar sangre ovina, se cruza con uno o varios cortes del medio de cultivo con el ansa, aumentando así el desarrollo de colonias en microaerofilia (como se ilustra en la **Figura 2**, protegiendo la producción de hemolisina O (oxígeno lábil), que permite exacerbar la beta-hemólisis en la zona de estrías en profundidad y aumentar la sensibilidad del cultivo.

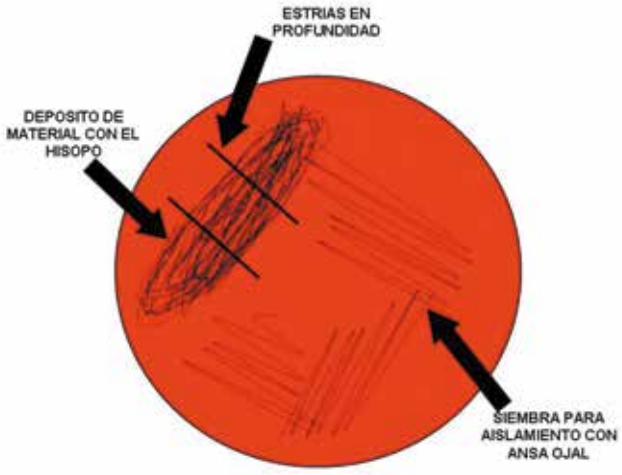


Figura 2. Método de siembra de hisopado de fauces.

Incubar a 35 - 37ºC por 24 hs, en atmósfera de 5 a 10% de CO_2 (método alternativo de recipiente con vela y algodón humedecido con água). Si no se observan, en 24 horas, colonias ß-hemolíticas, la incubación debe prolongarse 24 horas más.

Ventajas de la sangre ovina

1. Permite una mejor visualización de la hemólisis a las 24 horas.
2. Tiene una menor cantidad de NAD libre, lo que determina un crecimiento defectuoso de *Haemophilus haemolyticus* y *Haemophilus parahaemolyticus*. Estos microorganismos crecen bien con sangre humana y pueden confundirse con estreptococos beta-hemolíticos.
3. La sangre humana puede tener anticuerpos antiestreptococos y/o antiestreptolisina, que inhiban el desarrollo de estreptococos beta-hemolíticos y no debe ser utilizada por riesgo biológico.

Desventajas de la sangre ovina

1. Costos elevados.
2. Difícil mantenimiento, por el período de escasa estabilidad en el laboratorio.

> **Actualmente las recomendaciones de OMS y normativas vigentes para la implementación de medidas de seguridad y control de calidad de laboratorios, exige el uso de sangre ovina.**

D. Lectura e interpretación de los resultados

La evaluación del cultivo implica: observar tipo de colonias (morfología, disposición, consistencia, tamaño, presencia de beta-hemólisis, etcétera).

Inicialmente, realizar coloración de Gram y prueba de catalasa, a colonias beta-hemolíticas de cocos grampositivos.

Streptococcus pyogenes se observa como cocos grampositivos, catalasa negativo.

Es además:

- Bacitracina sensible.
- Prueba de PYR positiva.
- Prueba de Voges-Proskauer positiva (se utiliza para casos dudosos).

Las pruebas serológicas, pueden realizarse buscando antígenos de los grupos A, C, y G.

Para la tipificación se utilizan pruebas bioquímicas y serología.

El cultivo no tiene poder discriminatorio, entre cuadros de faringitis estreptocócica verdadera y portadores sanos de SGA cursando una faringitis viral.

Cuadro 1. Resumen diagnóstico de faringitis bacteriana

Toma de muestra
- Hisopado de pared posterior de faringe y amígdalas
- Conservación: Temperatura ambiente (24 hs)
- Para transporte: Medio de Stuart o semejante
Examen directo (Coloración de Gram)
- Carece de importancia (No se realiza ni informa).
- Sólo es útil en Angina de Vincent y candidiasis oral.
Cultivo
- Aislamiento en agar sangre ovina.
- Búsqueda de colonias β-hemolíticas.
- Identificación bioquímica-serológica.
Incubación
- 48 horas (Observar a las 24 horas).
Sensibilidad
- No se realiza, excepto alergia a antibióticos beta-lactámicos.

Recomendaciones para la optimización del método de cultivo

Diversos autores recomiendan, para obtener una mayor sensibilidad, usar las siguientes alternativas:

a. Agar sangre ovina, anaeróbicamente, durante 48 horas.
b. Agar sangre ovina, en aerobiosis, con cortes perpendiculares en las primeras estrías, durante 48 horas.
c. Agar sangre ovina con trimetoprima-sulfametoxazol (TMS), en 5 a 10% de CO_2, durante 48 horas.

d. Agar sangre ovina con TMS, en anaerobiosis, durante 48 horas.

> Falsos negativos del diagnóstico por cultivo

a. Tratamiento antimicrobiano previo.
b. Toma de muestra incorrecta.
c. Metodología inadecuada.

> Falsos positivos en el diagnóstico por cultivo

a. Paciente portador de *S. pyogenes* cursando faringitis de diferente etiología (ejemplo: viral). Se identifica por niveles no aumentados de antiestreptolisina O en suero.
b. Estreptococos beta-hemolíticos de otros grupos que pueden dar positiva la prueba de la bacitracina. Se diferencian por ser PYR y/o serología negativos, por lo que es importante realizar estas técnicas.
c. Por falta de realización de coloración de Gram a las colonias beta-hemolíticas y desarrollo de *Arcanobacterium haemolyticum* o *Haemophilus haemolyticus* en agar sangre humana. Se evita utilizando agar sangre ovina.

> E. Sensibilidad antimicrobiana

Aún no ha sido detectada la resistencia a penicilina, droga de elección en el tratamiento de faringitis estreptocócica. Por lo que de rutina no se deben realizar ensayos de sensibilidad a esta droga. Sólo se realiza con fines epidemiológicos y de investigación.

En pacientes alérgicos a los beta-lactámicos. Se debe estudiar la sensibilidad a antimicrobianos de la familia de los macrólidos, debido a un aumento de la resistencia a los mismos en los últimos años.

> F. Informe

Durante el XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología – X Congreso Argentino de Microbiología (Octubre/2004) se establecieron una serie de consensos para normatizar diferentes informes de análisis bacteriológicos que aún siguen vigentes para Latinoamerica.

Para hisopado de fauces se ha propuesto el informe que se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Modelo de informe de análisis bacteriológico.

Exudado de fauces		
Examen microscópico		
Coloración de Gram: cualitativa/cuantitativa	**Si** en asociación fusoespirilar y candidiasis bucofaríngea.	
	No se hace de rutina. No se informa.	
Resultado	Negativo	1) No se obtuvo desarrollo de *Streptococcus* ß-hemolítico. 2) Flora habitual.
	Positivo	1) Desarrollo de *Streptococcus pyogenes* (Grupo A). 2) *Streptococcus* ß-hemolítico No Grupo A. (1) 3) *Streptococcus* C ó G con sus respectivas especies (1). 4) Desarrollo de otros agentes etiológicos de faringitis.
Pruebas de sensibilidad	No se realiza de rutina, solo se prueban macrólidos en pacientes alérgicos a penicilina.	

(1) Descartando *S. anginosus.*

Otras etiologías bacterianas y situaciones especiales en infecciones de las vías aéreas superiores

Faringitis gonocócica

Ante sospecha por hábitos sexuales del paciente, sembrar la muestra en Thayer Martín y agar chocolate e incubar 48 a 72 horas en 3 a 10 % de CO_2. Siempre acompañar con los medios necesarios para la búsqueda de

S. pyogenes. Se debe realizar tipificación y sensibilidad según metodología adecuada.

> Búsqueda de *Corynebacterium diphtheriae* (conocido también como bacilo de Klebs-Löffler)

Se debe obtener parte de la membrana adherente con pinza estéril o hisopar enérgicamente la zona afectada.

El procesamiento debe ser inmediato.

El diagnóstico de difteria, basado en el examen microscópico de la muestra en un frotis coloreado, carece de valor, dado que puede obtenerse resultados falsos, positivos o negativos.

El diagnóstico de difteria es clínico debido a la urgencia.

El laboratorio cumple una importante función en el diagnóstico con fines epidemiológicos y de investigación, pues debe aislar la cepa y demostrar la producción de toxina, lo que insume un tiempo no útil en el urgente diagnóstico y tratamiento.

Coloración de Gram

Se realiza en la forma habitual y sólo se puede informar la presencia o no de "difteroides", es decir de bacilos grampositivos que se parecen y pueden confundir con *C. diphtheriae* y son presumiblemente especies de *Corynebacterium*.

Los difteroides son bacilos grampositivos pleomórficos, se tiñen irregularmente y pueden contener gránulos metacromáticos (polifosfatos), detectables con la coloración de Albert. Las células pueden disponerse en empalizada o en V, semejando configuraciones cuneiformes o "letras chinas".

En conclusión, un informe donde se observa población bacteriana compatible con *Corynebacterium*, sería: "Se observan bacilos grampositivos de morfología, coloración y disposición que recuerda a *Corynebacterium*".

ultivo y determinación de toxigenicidad

Dada la importancia epidemiológica del diagnóstico, se realizan en Laboratorios de Referencia.

> Búsqueda de Angina de Vincent (Asociación fuso-espirilar)

La Angina de Vincent, es una infección sumamente rara, pseudomembranosa o ulcerativa de las encías, boca o faringe, generalmente unilateral; aparece en pacientes con higiene deficiente de boca.

Puede reconocerse por lesiones ulcerativas grises de la faringe posterior, olor fétido del aliento del paciente y por el frotis coloreado por técnica de Gram.

La toma se debe realizar a nivel de la falsa membrana.

Realizar un frotis y teñirlo por el método de Gram.

El diagnóstico se basa en el examen microscópico directo de este frotis coloreado.

Se observa asociación de dos microorganismos, presentes en gran abundancia: bacilos gramnegativos fusiformes, anaeróbicos, muy largos (6 a 12 micras), en forma de huso, y por otro lado, espiroquetas gramnegativas, finas y onduladas: la asociación fusoespirilar.

Como estos organismos se encuentran normalmente en la boca, el cultivo no ayuda al diagnóstico.

El tratamiento se debe iniciar en base a la clínica y la coloración de Gram.

Es muy importante diferenciar las pseudomembranas de la Angina de Vincent con la lesión similar de la difteria.

Cuadro 2. Metodología diagnóstica de faringitis según etiología.

	Gram	Cultivo	Clínico
Faringitis estreptocócica		X	
Angina de Vincent	X		
Difteria			X

> Búsqueda de portadores nasales de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR)

Este análisis no debe realizarse de rutina, ya que un alto porcentaje de personas sanas son portadores de SAMR.

Se justifica su estudio, en presencia de un brote epidemiológico, nosocomial o previo a una cirugía.

En el caso de brotes, la búsqueda solo debe realizarse en las personas involucradas.

Se realiza hisopando ambas narinas.

La siembra puede realizarse en agar sangre, agar chocolate o agar manitol salado o medios cromogénicos diferenciales para SAMR.

La búsqueda está dirigida **exclusivamente** a la detección de SAMR, es decir, que **sólo se debe** ensayar la sensibilidad frente a los betalactámicos, utilizando cefoxitina como marcador.

El disponer de medios cromogénicos posibilita el diagnóstico de SAMR en 24 horas.

Exudado nasofaríngeo

a. Pruebas de laboratorio obligatorias: aislamiento e identificación de *Bordetella pertussis* o detección mediante PCR.
b. Pruebas de laboratorio optativas: detección de antígeno de *B. pertussis* mediante inmunofluorescencia directa, estudio de sensibilidad de *B. pertussis* en caso de fracaso terapéutico.

Brote por meningococo

Ante la existencia de un brote por este microorganismo se debe realizar su pesquisa en fauces para erradicar la portación.

Infecciones de las vías respiratorias bajas (IVR bajas)

Las infecciones del tracto respiratorio inferior son una causa importante de morbilidad y mortalidad. La muestra clínicas son diversas y el diagnóstico bacteriológico se complica por la dificultad de evitar contaminación con la población microbiana del tracto respiratorio superior.

El laboratorio de bacteriología tiene un rol fundamental en el diagnóstico etiológico de la neumonía y debe asegurar que la muestra sea representativa del proceso infeccioso que se intenta diagnosticar.

La colonización orofaríngea (población bacteriana habitual del tracto respiratorio alto), la falta de especificidad del esputo o secreciones traqueales, las dificultades clínicas y/o radiológicas para establecer el diagnóstico de neumonía en pacientes ventilados, hacen que un gran números de ellos queden sin diagnóstico y sean tratados con antimicrobianos, seleccionando cepas resistentes y retrasando el hallazgo de la verdadera causa del infiltrado.

Determinar la etiología, permite plantear un tratamiento dirigido y su búsqueda debe realizarse empleando criterios de costo-eficacia.

Los microorganismos responsables de neumonía adquirida en la comunidad en pacientes inmunocompetentes son variables, siendo las bacterias más frecuentes: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae, Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, bacilos gramnegativos, bacterias anaeróbicas y *Legionella pneumophila* (menos frecuente en nuestro país).

La etiología polimicrobiana es habitual en neumonías aspirativas, con bacterias anaerobios o infección mixta. También es usual en neumonías intrahospitalarias, principalmente en las asociadas a ventilación mecánica.

Todo esto, habla de la necesidad de realizar inicialmente, técnicas sensibles pero a la vez específicas, como los cultivos cuantitativos de cepillo envainado (CEP) y lavado broncoalveolar (BAL) y muestras obtenidas por fibrobroncoscopía.

Sin embargo, estas técnicas invasivas se reservan para:

- Pacientes que han recibido un apropiado tratamiento empírico pero que no responden adecuadamente.
- Pacientes que presentan inmunodeficiencias (alcohólicos, diabéticos, en tratamiento con drogas inmunosupresoras, VIH positivos, entre otros).

- Pacientes en los que se sospecha un diagnóstico alternativo, por ejemplo carcinoma.

Consideraciones generales

a. Para una evaluación de la muestra que permita orientar hacia el agente etiológico y seleccionar los medios de cultivo apropiados, es importante saber si:
   * el paciente está internado o es ambulatorio.
   * el paciente está sometido o no a ARM (Asistencia Respiratoria Mecánica).
   * es inmunosuprimido.
   * tiene enfermedad fibroquística del páncreas.
   * está recibiendo antimicrobianos y cuáles.
   * si el proceso pulmonar es crónico. En este caso debería realizarse de rutina la búsqueda de otros microorganismos (micoplasmas, hongos, micobacterias).

b. El tracto respiratorio superior, es la fuente más importante de contaminación para muestras de esputo, secreción traqueal, aspirado nasofaríngeo y lavado bronquial.
   El árbol traqueobronquial en personas sanas, normalmente es estéril o con muy baja concentración de bacterias. Tanto la cantidad como la frecuencia de colonización, se incrementan en pacientes con enfermedad pulmonar crónica, traqueostomía o intubación endotraqueal.
   Por estas razones, las muestras anteriormente mencionadas, no son válidas para el cultivo de anaerobios y son muchos menos específicas para patógenos potenciales aerobios, que las obtenidas por métodos fibroendoscópicos: cepillo envainado (CEP), protegido o no, o lavado broncoalveolar (BAL).

c. En general, los agentes etiológicos de la neumonía se encuentran en recuentos mayores a 10^6 UFC/ml en las secreciones bronquiales.
   Cuando son menores, se los considera colonizantes. Este es el fundamento de las técnicas cuantitativas.

d. Algunos microorganismos deben ser considerados siempre patógenos, independientemente del tipo y calidad de la muestra, por ejemplo: *Mycobacterium tuberculosis*. Se debe realizar siempre baciloscopia, aunque el médico no lo solicite, con finalidad diagnóstica y epidemiológica.

e. La importancia de la presencia de patógenos potenciales, *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis*, bacilos gramnegativos y *Staphylococcus aureus*, deben ser evaluados teniendo en cuenta el tipo y calidad de la muestra, desplazamiento o no de la población bacteriana normal, datos clínicos, radiológicos e histopatológicos, si están disponibles.

f. La biopsia de pulmón a cielo abierto es la muestra de mayor sensibilidad y especificidad, pero esta técnica se reserva sólo para situaciones puntuales, donde no se ha podido llegar al diagnóstico por otras técnicas menos invasivas y existe un serio y progresivo deterioro del paciente.

   Estas muestras deben ser enviadas en contenedores estériles, rápidamente al laboratorio. Deben enviarse en 1 ml de solución fisiológica estéril para evitar su desecación.

   Los protocolos de trabajo de cada institución de salud deberían incluir coordinación entre médico actuante y bacteriólogo para que las muestras sean rápidamente procesadas.

g. La microscopía directa brinda datos muy importantes, la presencia de células epiteliales escamosas (CEE) es indicadora de contaminación orofaríngea, los leucocitos polimorfonucleares (PMN) acompañan la respuesta inflamatoria, no siempre de origen infeccioso.

   Se debe observar además, si existen bacterias predominantes y células fagocíticas conteniendo microorganismos intracelulares y orientar hacia qué medios de cultivo utilizar (Ejemplo: la visualización de bacilos gramnegativos obliga a sembrar la muestra además en un agar lactosado).

h. Idealmente las muestras deben tomarse antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano, el que disminuye considerablemente la sensibilidad y especificidad de los cultivos.

i. La toma de hemocultivos es importante para un valor diagnóstico y pronóstico de una neumonía. También puede ayudar a interpretar recuentos dudosos con las técnicas cuantitativas. Tienen relativa especificad debido a que pueden coexistir otros focos y baja sensibilidad (10 – 20%) por el elevado número de falsos negativos.

j. Siempre que se disponga de la metodología, se deben investigar otros agentes: *Legionella pneumophyla*, *Chlamydia pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae* para los que se utilizan técnicas serológicas y de biología molecular como la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Tipo de muestras

> Muestras obtenidas por procesos no invasivos (Muestras Cuestionables)

- Esputo
- Secreción Traqueal

> Muestras obtenidas por procesos invasivos (Muestras Incuestionables)

- Líquido de Punción Pleural
- Hemocultivos
- Broncoscopía con cepillo protegido
- Lavado brocoalveolar

> Pruebas de laboratorio obligatorias independientemente de la muestra recibida de vías aéreas inferiores

- Examen microscópico de frotis coloreado por tinción de Gram (en el caso de los esputos sirve para jerarquizar la muestra en 100X).
- Cultivo semicuantitativo o cuantitativo en medios adecuados para el aislamiento, identificación y estudio de sensibilidad de: *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus* spp., bacilos gramnegativos fermentadores y no fermentadores y *Staphylococcus aureus* y otros grampositivos causantes de neumonía.
- Aislamiento e identificación del género *Legionella* si existe sospecha clínica y epidemiológica (alternativamente se puede realizar la detección de antígeno de *Legionella* en orina).
- Aislamiento e identificación del género *Nocardia*, si existe sospecha clínica y epidemiológica.

> Pruebas de microbiológicas de laboratorio optativas

- Cultivo de hongos y/o micobacterias si hay sospecha clínica.
- Cultivo de anaerobios en las muestras de cepillado bronquial.

La muestra más accesible y más simple de lograr es el **esputo** y por lo tanto se debe respetar las indicaciones para su obtención y extremar los cuidados al trabajar con la misma.

Tener en cuenta que las muestras más fáciles de obtener suelen ser las más difíciles de evaluar.

Su estudio presenta claramente ventajas y desventajas:

Ventajas

- Muestra de extracción no invasiva, inocua, fácil y accesible para el paciente, con excepción de aquellos que no pueden expectorar (especialmente niños y ancianos).

Desventajas

- Contaminación con población bacteriana habitual y/o colonizante, transitoria, de orofaringe, la que a su vez puede ser agente del proceso infeccioso. Se corrige efectivamente esta desventaja, jerarquizando la muestra (observación en 100X de menos de 10 CEE y más de 25 PMN).
- Su utilidad es muy discutida en pacientes con neumonía hospitalaria, por su baja especificidad, debido a la colonización de la vía aérea superior con bacilos gramnegativos y estafilococos.
- Muestra no válida para anaerobios, dado que atraviesa orofaringe donde los anaerobios son colonizantes.

Instrucciones para la obtención de esputo

La muestra obtenida por expectoración es una de las más importantes para el diagnóstico microbiológico de la neumonía de la comunidad. Las indi-

caciones dadas al paciente para la toma de muestra, deben ser claras y precisas, evitando el uso innecesario de vocabulario técnico.

La muestra de esputo debe tomarse preferiblemente por la mañana (existen menos probabilidades de que existan restos de alimentos y las secreciones se producen y concentrar durante el sueño nocturno).

Indicar al paciente el lavado de manos y el enjuague bucal con solución salina, bicarbonato o agua.

La expectoración debe ser profunda y producida por un esfuerzo de tos. Instruir al paciente para que no expectore saliva ni descarga post-nasal a nasofaríngea.

El paciente debe depositar en un envase estéril, hermético y de boca ancha, el material que procede del interior de los pulmones.

Para ello:

- Inspirar profundamente.
- Retener por un instante el aire en los pulmones.
- Lanzarlo violentamente hacia afuera con un esfuerzo de tos.
- Repetir esta operación hasta obtener por lo menos tres esputos, dentro del envase estéril que se ha entregado, evitando que se escurra por sus paredes exteriores.
- Tapar y cerrar correctamente dicho envase.
- Si una porción de la secreción se ha escurrido por las paredes, limpiar con papel absorbente que se debe quemar inmediatamente, pues está contaminado.
- Lavarse las manos y colocar el envase en una bolsa con hielo o en heladera (no congelador ni freezer).
- Enviar al laboratorio.
- Cuidar que la boca del envase esté siempre hacia arriba.
- Transportar al laboratorio en cadena de frío.

Si el paciente está internado es conveniente que el profesional de salud a cargo, verifique las características de la muestra para evitar distorsionar y retrasar en el diagnóstico al enviar muestras que contengan mayormente saliva.

Transporte y conservación de la muestra

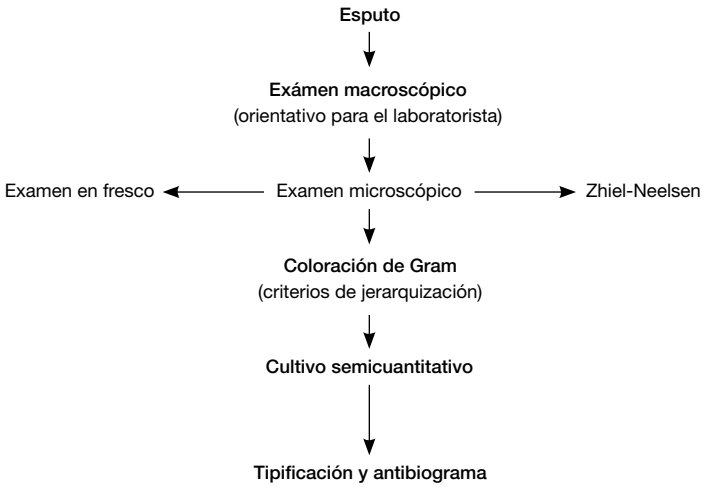
Las muestras deben llevarse al laboratorio lo más rápido posible, idealmente dentro de los 30 minutos de obtenidos, debiendo ser procesados de inmediato.

Si no pueden procesarse en este lapso, se deben conservar en heladera (no en congelador ni freezer), donde pueden permanecer hasta 12 horas.

> **Recordar que el frío prolongado disminuye la recuperación en cultivos de *S. pneumoniae y H. influenzae.***

No dejar la muestra a temperatura ambiente, algunas bacterias como *S. pneumoniae y H. influenzae*, pierden sus caracteres morfológicos y tintoriales al quedar a temperatura ambiente en contacto con bacteriocinas de otras bacterias y la acción de leucocitos, siendo además considerable el sobrecrecimiento de enterobacterias, BGNNF (Bacilos Gramnegativos No Fermentadores) o levaduras de crecimiento rápido, que al multiplicarse, conduce a errores en el diagnóstico.

> **En conclusión el frío por períodos prolongados, atenta contra la viabilidad de algunos microorganismos y la temperatura ambiente es perjudicial por lo ya comentado.**



Flujograma 2. Procesamiento de muestras de esputo.

Esputo

a. Observación macroscópica

Observar el aspecto macroscópico de la muestra (presencia de saliva, sangre, color, olor, consistencia). Estos elementos deben ser considerados sólo como guías para el laboratorista ya que los tratamientos previos, pueden modificarlos, no permitiendo asociar las características macroscópicas con ciertos microorganismos en forma categórica.

Así, por ejemplo, la "sospecha" de *Klebsiella* spp., o la fermentación de restos alimenticios, otorga al esputo un aspecto espeso, pegajoso y verdoso y un proceso por bacterias anaeróbicos, es acompañado de olor fétido.

Estos elementos sólo sirven como ayuda.

b. Examen microscópico

Todas las muestras clínicas que son obtenidas por expectoración espontánea o mediante broncoaspiración o aspiración traqueal por nariz o por boca, están sujetos a contaminación por la población bacteriana oral.

Coloración de Gram (Criterios para jerarquizar la muestra)

- Evaluar si la muestra es significativa: Existen diferentes criterios para jerarquizar.

El más aceptado tiene en cuenta la presencia de **más de 25 leucocitos polimorfonucleares (PMN) y menos de 10 células epiteliales por campo 100X.**

- Efectuar una descripción de la reacción tintorial, morfología y disposición de los microorganismos predominantes utilizando objetivo de inmersión (1000X).
- Se debe informar presencia o no de respuesta inflamatoria con diferenciación celular y recuento de leucocitos y seguidamente las características de la población bacteriana observada en 1000X.
- Las consideraciones para jerarquizar la muestra no se informan, sirven al profesional para evaluar la calidad del material recibido y tomar decisiones.

Tener en cuenta:

- En pacientes leucopénicos, muestras sin leucocitos y sin células epiteliales pero con células ciliadas originadas en el tracto respiratorio inferior, son representativas.
- No pretender dar nombres a las bacterias observadas en un simple examen microscópico directo del esputo.
- *Streptococcus pneumoniae* puede observarse en predominio o como desplazante (único microorganismo observado) y sin embargo existe la posibilidad de cultivos sin su desarrollo debido a la presencia de proteasas leucocitarias o microbianas.
- No omitir las grandes formas de hongos que se encuentran o la presencia de levaduras, brotantes o no y pseudomicelios.
- Atender a la presencia de formas finas y filamentosas de *Actinomyces* y *Nocardia*.

- A menudo, el extendido coloreado por el método de Gram, es útil para diferenciar la infección bacteriana de la colonización o contaminación.
- La presencia de leucocitos PMN con una gran densidad de microorganismos nos hace sospechar de infección.
- La ausencia de dichas células y presencia de microorganismos, podría deberse a una contaminación, o si se reitera este hallazgo, una colonización.
- Relacionar estos datos siempre con los datos clínicos.
- Realizar siempre coloración de Ziehl-Neelsen. Esto permite detectar ocasionalmente casos bacilíferos y cortar la cadena de transmisión de tuberculosis al permitir tratamiento rápido y adecuado.
- Recordar la importancia de lo observado en la coloración de Gram, en pacientes internados y ambulatorios graves, que de ser categórica (población bacteriana única desplazante o franco predominio) permite definir el tratamiento empírico inicial, mientras se espera el cultivo, identificación y sensibilidad.

c. Cultivo semicuantitativo

Sembrar:

- Placas de agar sangre en atmósfera 5 a 10% de CO2 (método alternativo de lata con vela y algodón humedecido con agua).
- Placas de agar chocolate en atmósfera 5 a 10% de CO2, cuando se sospecha de microorganismos exigentes, como Haemophilus influenzae, ya sea por la visualización de estructuras morfológicamente compatibles en la coloración de Gram o por clínica y epidemiología.

Se pueden utilizar como medios de aislamiento, además:

- Agar sangre: Realizar la prueba de satelitismo con la inoculación de una cepa de *Staphylococcus* spp., microorganismo capaz de producir el factor V.
- Agar chocolate con Isovitalex®.
- Levinthal´s Agar: cualquiera sea el medio utilizado observar las colonias con lupa.
- Medios selectivos para bacilos gramnegativos, ante su sospecha u observación en la coloración de Gram, como microorganismo predominante.

Esputo: Cultivo semi-cuantitativo

Para realizar un cultivo semi-cuantitativo, la muestra de esputo debe sembrarse de la siguiente manera:

- Tomar una ansada de la muestra seleccionando las partes purulentas o mucopurulentas. Si la consistencia de la misma hace difícil la toma, verter el esputo en una placa de Petri estéril, para mejor selección de la porción a sembrar.
- Sembrar la placa como se muestra en la Figura 3. Se sugiere, orientar la cuarta estría en sentido diferente a las demás, para facilitar su ubicación, al momento de evaluar los cultivos o identificarla correctamente.

Recordar NO QUEMAR el ansa entre estrías

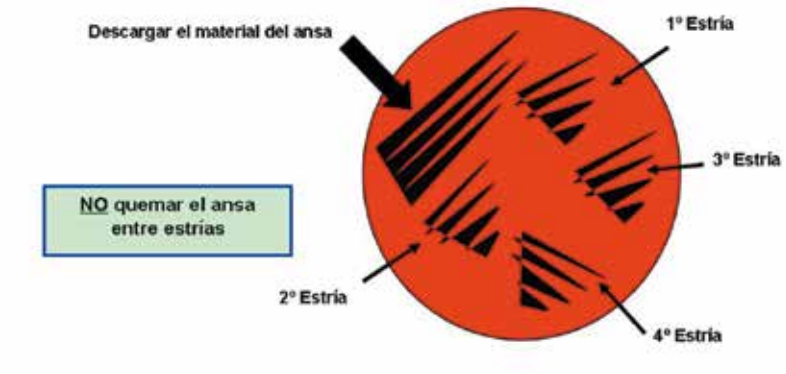


Figura 3. Método de siembra semicuantitativo.

Lectura e interpretación de los cultivos

Una vez producido el desarrollo, luego de la incubación a 35 ºC por 24 a 48 horas, observar y estudiar las colonias que se encuentran en predominio (más de cinco colonias de aspecto semejante) en la 4º estría.

Definir tipo de colonias (morfología, color, disposición, consistencia, tamaño, hemólisis en agar sangre, crecimiento difuso, predominio) y realizar coloración de Gram.

Establecer, luego de la observación macro y microscópica de las colonias desarrolladas, los pasos a seguir para la tipificación y sensibilidad del microorganismo hallado.

Recordar:

- *Haemophilus infuenzae* debe ser considerado en pacientes fumadores y con co-morbilidades.
- Cultivo para *Mycoplasma* cuando es solicitado y posible de realizar.
- Cultivo para *Mycobacterium tuberculosis* y hongos, si se sospecha de ellos y es solicitado.
- Cultivo para *Bordetella pertusis*, si lo solicita el médico ante sospecha. Esta siembra se realiza al pie de la cama del paciente, por la labilidad de este germen, en medio de Bordet Gengou.

Recordar que las únicas muestras válidas para el estudio de anaerobios, en las infecciones de las vías respiratorias bajas, son las obtenidas por punción (trans-traqueal, pulmonar o pleural) o por fibrobroncoscopía con cepillo protegido.

Cultivo de secreciones

Para mejorar la especificidad del cultivo de secreciones existen:

- Técnicas cuantitativas con un punto de corte mayor a 106 UCF/ml.
- Muestras protegidas, tomadas por fibrobroncoscopía.

Muestras obtenidas por fibrobroncoscopia

En pacientes intubados con o sin ARM, las muestras obtenidas a través del tubo endotraqueal no son recomendables, ya que es frecuente el hallazgo de bacterias colonizantes (frecuentemente multirresistentes como *Acinetobacter* spp. u otros BNF).

La broncoscopía con cepillo protegido reduce sensiblemente el arrastre de bacterias de la orofarínge pero no las elimina totalmente, por ello es indispensable realizar el recuento de colonias.

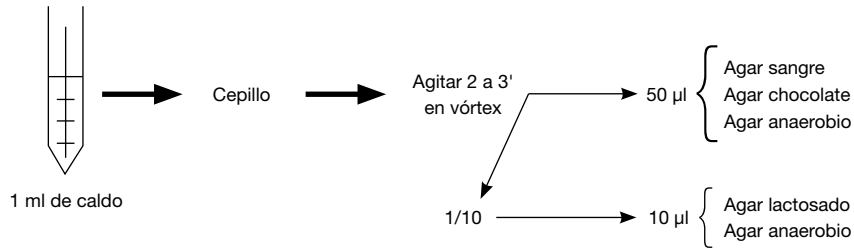
Cepillo Envainado o Protegido (CEP)

Con el objeto de evitar la contaminación orofaríngea, se ha desarrollado un sistema de doble catéter, con cánulas telescópicas y un tapón distal.

El cepillo envainado será colocado por el neumonólogo en un tubo a rosca estéril. Los especímenes deben ser procesados dentro de los 30 minutos de su extracción, no debiendo superarse las 2 horas dado que la muestra obtenida es escasa (0,01 a 0,001 ml) y está sometida a desecación.

Recordar que no debe dejarse a temperatura ambiente, pues el recuento de colonias no tendría valor.

Recordar que deben colocarse de inmediato en heladera (4 a 8ºC), donde puede permanecer hasta 24 horas.



Metodología de siembra para muestras obtenidas por CEP.

Se incuban las placas de agar sangre y agar chocolate (atmósfera húmeda, con 5 a 10% de CO2), agar lactosado en aerobiosis y agar anaerobio, en atmósfera de anaerobiosis, durante al menos 72 horas a 35°C.

Es importante tener en cuenta que la solución fisiológica puede ser inhibitoria para *Legionella* spp., y disminuye los recuentos de anaerobios, *H. influenzae* y *S. pneumoniae*, por lo que para la realización de las diluciones es recomendable utilizar agua estéril o caldo tripteína soya.

Criterios de jerarquización

Puntos de Corte (PC):

- ≥ 103 UFC/ml en pacientes sin tratamiento antimicrobiano previo.
- ≥ 102 UFC/ml en pacientes con tratamiento antimicrobiano previo.

Debido a la escasa superficie alveolar que se rastrilla, el CEP no es apto para la búsqueda de *M. tuberculosis* ni de hongos dimórficos (*H. capsulatum*, *P. braziliensis*, y otros) – si es de utilidad para la búsqueda de anaerobios.

Lavado Broncoalveolar (BAL)

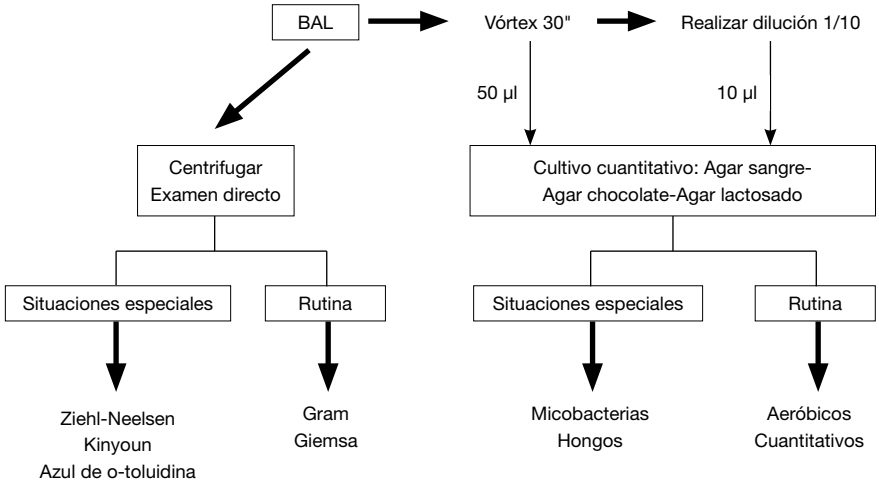
Se lava un segmento pulmonar con líquido estéril. Es importante que se envíen por separado (2 ó 3 jeringas diferentes) las fracciones que se recuperan, ya que la primera es la más contaminada por lo que tiene un valor semejante a las secreciones traqueales para investigar microorganismos habituales.

Si las muestras no son procesadas dentro de los 30 minutos de su extracción, pueden conservarse en heladera (4 a 8°C) hasta 24 hs, sin que se altere significativamente el recuento bacteriano.

Es importante que se envíe el dato de los mililitros de volumen instilado y de los mililitros de volumen recuperado, a fin de realizar el recuento bacteriano.

> **Recordar que no debe dejarse a temperatura ambiente, pues el recuento de colonias no tendría valor.**

Recordar que deben colocarse de inmediato en heladera (no congelador ni freezer), donde puede permanecer hasta 24 horas.



Flujograma 4. Procesamiento para muestras obtenidas por BAL.

Las placas de agar sangre y agar chocolate (atmósfera húmeda, con 5 a 10% de CO_2) y agar lactosado (aerobiosis) se incuban durante al menos 72 horas a 35°C.

Para la realización de las diluciones, es recomendable utilizar agua estéril o caldo tripteína soya, por lo comentado anteriormente.

Criterios de jerarquización

Puntos de Corte (PC):

- ≥ 10^4 UFC/ml en pacientes sin tratamiento antimicrobiano previo.
- ≥ 10^3 UFC/ml en pacientes con tratamiento antimicrobiano previo y ≤ 1% de células epiteliales escamosas.

Resulta importante tener presente que en pacientes hospitalizados y con ARM, cerca del 25% de las neumonías son polimicrobianas. En estos casos se calcula en el BAL el Indice Bacteriano (I.B.), establecido por Johanson y col. como el valor obtenido al aplicar el logaritmo decimal a cada recuento bacteriano individual (para cada género y especie) y luego sumarlos. El punto de corte (PC) que se utiliza para definir infección mixta o polimicrobiana, es un I.B. > 6.

Tener en cuenta que:

- Si el porcentaje (1%) de células epiteliales escamosas, contando al menos 200 a 300 elementos entre macrófagos, PMN y células epiteliales escamosas, se supera, se estaría en presencia de una muestra contaminada por secreciones de las vías aéreas superiores.
- La presencia de células ciliadas bronquiales también podría ser considerada un indicio de contaminación
- Si no se observan macrófagos ni PMN, podría deberse a una muestra muy diluida, o bien que no se trate de neumonía (ya que es improbable en pacientes no neutropénicos) o deberse al sitio de donde se tomó la muestra.
- Es útil buscar la presencia de bacterias intracelulares, ya que tienen una alta correlación con infección aguda.

El BAL posee una serie de ventajas sobre el CEP:

Ventajas:

- La muestra tiene mayor volumen lo que permite la realización de diferentes técnicas diagnósticas.
- Está menos afectada por el uso previo de antimicrobianos, probablemente por el volumen recolectado y las diluciones realizadas.
- Es válida para la búsqueda de micobacterias y hongos.
- Es de bajo costo.

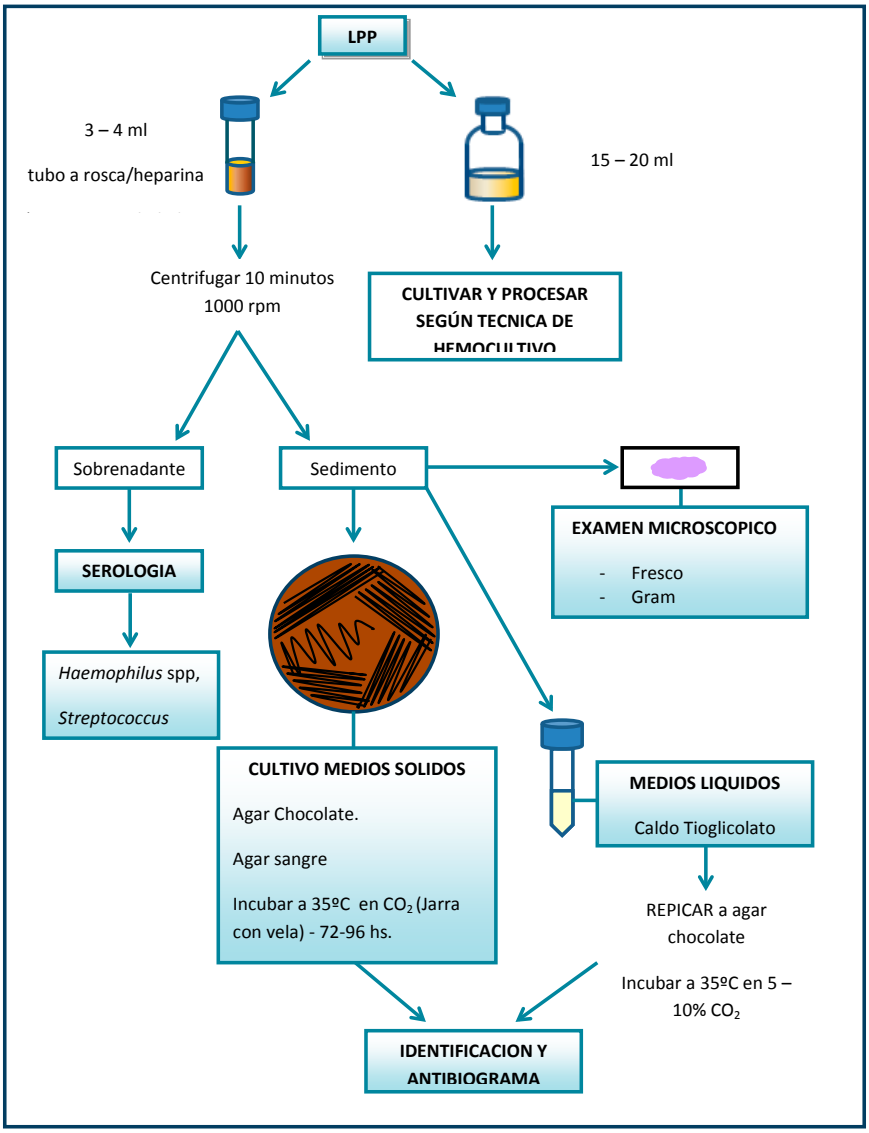
Desventajas :

- El ser una muestra no apta para el estudio de anaerobios.
- La toma de muestra se realiza a ciegas (el material recogido podría provenir de un sitio no afectado).

Líquidos de punción: Líquido de Punción Pleural (LPP), Punción Transtraqueal (PTT) y Punción Pulmonar Percutánea (PPT)

Muestras clínicas que se utilizan cuando:

- no se pudo llegar a un diagnóstico estudiando el esputo
- los pacientes no tienen respuesta al tratamiento instaurado
- se sospecha la presencia de anaerobios
- existe derrame pleural.



Flujograma 5. Procesamiento de Líquido de Punción Pleural (LPP).

La muestra más utilizada es el LPP, ya que las otras dos poseen contraindicaciones (pacientes intubados, hemoptisis, etcétera). Con frecuencia el cultivo de LPP es negativo ya que el paciente suele estar con antibioti-

coterapia instaurada cuando se realiza la toma de muestra. Su rendimiento aumenta en caso de empiema.

Las placas con medios sólidos y los tubos con medios líquidos, se incuban según corresponda (atmósfera húmeda con 5 a 10% de CO_2 o aerobiosis) durante al menos 72 horas a 35°C.

Debe informarse el aislamiento de cualquier microorganismo de interés.

Tener precaución, con aquellos que sólo crecen en medios líquidos y que sean microorganismos habituales de piel, ya que probablemente representen una contaminación.

En caso de microorganismos de crecimiento habitual en medios líquidos y sólidos, los medios líquidos nos sirven de control. Por ejemplo bacterias poco exigentes: Enterobacterias, *Pseudomonas* spp., estafilococos o enterococos.

Si microorganismos poco exigentes, desarrollan sólo en los medios líquidos y no lo hacen en los sólidos, es necesario supervisar los cultivos, ya que podría deberse a errores en la técnica de siembra o contaminaciones.

Recordar que toda muestra, para el estudio de neumonía, debe ser acompañada de hemocultivos, ya que clarifican la interpretación de los recuentos intermedios, ayudan a la orientación hacia otro foco posible de bacteriemia y colaboran en la identificación del agente etiológico en más del 20% de los pacientes con esta patología.

Recordar que frente a cultivos polimicrobianos, cada probable agente etiológico debe ser estudiado individualmente (tipificación y sensibilidad antimicrobiana).

Estudio de Sensibilidad Antimicrobiana

De producirse el aislamiento de cocos grampositivos, enterobacterias o BNNF, como agentes etiológicos de infecciones del tracto respiratorio, se debe recurrir al ensayo de la sensibilidad con la metodología que se desarrolla en el **Capítulo 9.**

Informes

Durante el XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología – X Congreso Argentino de Microbiología (Octubre/2004) se establecieron una serie de consensos para normatizar diferentes informes de análisis bacteriológicos. Estas conclusiones de expertos aún siguen vigentes.

La propuesta para el informe de estudios microbiológicos de las vías respiratorias inferiores, es la siguiente:

Tabla 1: Modelo de informe de esputo y/o aspirado traqueal.

Esputo/ Aspirado traqueal			
Examen microscópico:			
Examen en fresco (100x)	Células epiteliales escamosas	> 10	< 10
	Leucocitos	> 25	< 25
Coloración de Gram: Cualitativa/cuantitativa	Microorganismos	1. No bacterias 2. Flora predominante 3. Flora polimicrobiana	
Coloración de Ziehl Neelsen:	Negativa		
	Positiva	1. (+) menos de 1 BAAR por campo en 100 c/observados 2. (++) entre 1 y 10 BAAR por campo en 50 c/observados 3. (+++) más de 10 BAAR por campo en 20 c/observados	
Rto. de colonias: cuantitativo UFC/ml (solo en aspirado traqueal) **semicuantitativo**			
Resultado:	Negativo	1. Flora habitual 2. Muestra no representativa 3. Flora polimicrobiana	
	Positivo	Género y especie del patógeno potencial	
Prueba de sensibilidad			

Tabla 3: Modelo de informe para BAL.

Lavado broncoalveolar		
Examen microscópico:		
Examen en fresco (100x)	Células epiteliales escamosas	> 1% < 1%
	Leucocitos	Cuantitativo
	Macrófagos alveolares	Cualitativo
Coloración de Gram: Cualitativa / cuantitativa	Microorganismos	1. No bacterias 2. Flora predominante 3. Flora polimicrobiana
Col. Gram y/o Giemsa	Microorganismos intracelulares/extracelulares (se observan o no se observan)	
Col. Ziehl Neelsen	Ídem esputo	
Recuento de colonias: .....UFC/ml.		
Resultado:	Negativo	1. Negativo 2. No se observa desarrollo 3. Flora polimicrobiana
	Positivo	1. Monomicrobiano. Género y especie del patógeno potencial 2. Polimicrobiano. Cada género y especie con su recuento.
Prueba de sensibilidad: ver consenso.		

Otras técnicas disponibles para de diagnóstico de neumonía de etiología bacteriana:

Métodos serológicos

Se utilizan principalmente en el diagnóstico de neumonías producidas por bacterias atípicas (*M. pneumoniae*, *Ch. pneumoniae*, *Coxiella burnetti*, *L. pneumophila*). Aunque se han desarrollado las técnicas de biología molecular su utilidad sigue siendo fundamental y accesible a los laboratorios que no cuentan con el equipamiento necesario para estas pruebas.

Las técnicas de ELISA se realizan principalmente para *M. pneumoniae*. Las limitaciones son las siguientes: Los anticuerpos de tipo IgM pue-

den permanecer elevados durante meses (por lo que puede impedir el diagnóstico de infección reciente) y no aumentan en las reinfecciones. En la primoinfección las técnicas de detección de IgM tienen una buena sensibilidad y especificidad.

Existe un período de ventana de 10 – 14 días desde el inicio de los síntomas, por lo que un resultado negativo acompañado de sospecha clínica fundada obliga a repetir la prueba.

La IgG se incrementa tardíamente en procesos agudos y se eleva rápidamente en reinfecciones.

Por otro lado, la microinmunofluorescencia es la única técnica recomendada en la actualidad para el diagnóstico sistemático de las dos especies del nuevo género *Chlamydophila*, compuesto por *C. pneumoniae* y *C. psittaci*.

Detección de antígenos bacterianos

Antígeno de neumococo

En LPP su detección tiene una sensibilidad y especificidad mayor al 90%. Su detección en orina en niños pequeños, no es útil porque no permite el diagnóstico diferencial con portadores sanos y en los que recibieron la vacuna antineumocócica recientemente. Puede llegar a ser útil en niños mayores y adultos como predictor negativo de infección.

Antígeno soluble de *Legionella*

En orina tiene especificidad elevada (99%) y sensibilidad variable (60 – 90%), se recomienda su detección en brotes epidémicos o en neumonías graves.

Técnicas moleculares

Se utilizan principalmente técnicas de PCR convencional, multiplex PCR o las basadas en microchips arrays, utilizando cebadores descriptos en la bibliografía, destacan por su rapidez, sencillez y versatilidad. Incrementan

significativamente la sensibilidad diagnóstica en muestras de sangre y líquido pleural y tienen elevada especificidad.

Se han desarrollo principalmente hasta la fecha las que permiten el diagnóstico diferencial de neumococo, discriminando en este caso los distintos serotipos que producen la enfermedad.

Permiten el diagnóstico etiológico en pocas horas, se requiere sospecha clínica del agente para dirigir la búsqueda.

Se utiliza para estudios de brote y tipificación confirmatoria. Así como para confirmación de mecanismos de resistencia a nivel molecular y estudios de transmisión de dichos mecanismos o diseminación de cepas resistentes.

Tienen la desventaja de pérdida de material bacteriano viable aislado de muestra clínica para realizar los estudios de sensibilidad a antimicrobianos.

No siempre pueden implementarse estas metodologías en laboratorios de baja y mediana complejidad.

> Estudio de *Mycobacterium tuberculosis*

La connotación epidemiológica actual y las implicancias de salud pública que involucran al diagnóstico de tuberculosis, exigen el empleo de los medios necesarios para obtener la confirmación microbiológica, lo que constituye el diagnóstico de certeza.

Clínicamente el diagnóstico de tuberculosis se realiza en base a signos y síntomas característicos. No obstante el diagnóstico diferencial puede presentar obstáculos.

Cada laboratorio deberá evaluar su capacidad y considerar la derivación a *Mycobacterium tuberculosis* centros más especializados cuando resulte necesario.

El diagnóstico de certeza se basa en la identificación del agente causal en muestras de secreciones orgánicas o de tejidos:

El *Mycobacterium tuberculosis* (bacilo de Koch) es un bacilo ácido-alcohol resistente, aerobio, no formador de esporas e inmóvil. Su crecimiento es lento por lo que necesita de 18 hasta 60 días para desarrollar en medios complejos a 35°C de incubación.

Las micobacterias muestran generalmente una sensible preferencia nutricional por los lípidos; la yema de huevo ha sido un constituyente de los medios enriquecidos utilizados para su aislamiento.

Recolección de muestras

Las muestras a analizar pueden ser de origen respiratorio (esputo normal o inducido, lavado bronquial y broncoalveolar, contenido gástrico de aspirado respiratorio, biopsias endoscópicas o quirúrgicas) o no respiratorias (orina, LCR, sangre y médula ósea en inmunodeprimidos, punciones aspirativas y biopsias).

El mayor problema en la recuperación del *Mycobacterium tuberculosis* de muestras clínicas, naturalmente acompañadas de otras bacterias, como el esputo, es la presencia de un gran número de contaminantes. Este problema se resuelve parcialmente, obteniendo muestras frescas y refrigerando cualquier muestra que no se puede procesar de inmediato.

La muestra más frecuente que recibe el laboratorio de bacteriología ante la sospecha de TBC pulmonar es el esputo.

Se debe indicar la toma de muestra al paciente o a sus contactos siguiendo las instrucciones mencionadas anteriormente en este capítulo para la obtención de la muestra de esputo.

Para el estudio de tuberculosis (TBC) en muestras de esputo, se deben procesar por lo menos tres muestras, recogidas en días intermitentes no sucesivos (por la intermitencia en la eliminación bacilar).

En cada frasco (muestra), se solicita que el paciente junte de 8 a 10 esputos y conserve las muestras en heladera hasta su transporte con cadena de frío al laboratorio.

Para los pacientes que no expectoran en forma espontánea, por ejemplo en niños, otra muestra válida es la aspiración del contenido gástrico. El mejor momento para su obtención, es en las primeras horas de la mañana, antes del desayuno.

Como el objetivo del lavaje gástrico es obtener el esputo deglutido durante la noche, la muestra debe obtenerse por lo menos 8 horas después de que el paciente haya comido o ingerido medicación.

Microscopía

La baciloscopía (examen microscópico directo por coloración de Ziehl - Neelsen), permite confirmar el 65 a 80% de los casos de tuberculosis, dato informado por el Ministerio de Salud de la Nación en las Normas Técnicas 2013 del Programa Nacional del Control de la Tuberculosis.

La baciloscopía positiva diagnostica tuberculosis.

Según Ballester, en las normativas para el diagnóstico microbiológico de tuberculosis, guías y recomendaciones de la Asociación Argentina de Microbiología, año 2009; se requieren 5.000 – 10.000 bacilos/ml de muestra para que se detecten *M. tuberculosis* por baciloscopía.

La baciloscopía es una técnica sencilla, rápida y práctica que puede realizarse en laboratorios de baja complejidad por personal entrenado. Sólo requiere disponibilidad de soluciones colorantes, un microscopio óptico clásico y personal entrenado.

Su importancia es invaluable en los logros que puedan obtenerse en los planes de control de la tuberculosis a nivel mundial.

Todas las muestras de esputo deben examinarse en busca de bacilos ácido-alcohol resistente.

Esta característica hace que su microscopía tenga importancia fundamental.

El uso del método clásico de Ziehl-Neelsen determina esta propiedad: la retención del colorante después de su exposición a ácido-alcohol. Los componentes y la técnica de coloración son los siguientes:

- Carbolfucsina:
  Solución saturada de fucsina básica
  (3 gramos de fucsina básica en 100 ml
  de alcohol etílico 95%) .....10 ml
- Acido – alcohol:
  3 ml de HCl con alcohol etílico para un volumen de 100 ml.
- Contracolorante: Azul de metileno; 0,3% acuoso.

Fijar el frotis por calentamiento suave. Colocar carbolfucsina al portaobjeto y calentar hasta obtener vapores blancos, esperar hasta que los vapores desaparezcan y repetir este procedimiento tres veces. Lavar con agua de canilla. Decolorar con alcohol – ácido hasta que no aparezca más color en los lavados. Lavar con agua de canilla. Contracolorear con azul de metileno 30 segundos. Lavar con agua de canilla y secar al aire.

También puede utilizarse la microscopía de fluorescencia con fuorocromo auramina-rodamina B y microscopios LED (light emision diode) donde se aprecian los bacilos como puntos brillantes sobre fondo negro.

La microscopía ayuda fundamentalmente a:

- Cortar la cadena epidemiológica de contagio, al detectar a los casos bacilíferos que son los que mantienen la enfermedad.
- Detectar los nuevos casos de infección.

Al ser cuantitativa y seriada, es útil para registrar el progreso de la enfermedad y puede ser utilizada como criterio para el seguimiento de la evolución, control y eficacia o no del tratamiento instituido, en aquellas regiones donde la determinación de la sensibilidad no está disponible.

Es conveniente tener en cuenta las siguientes indicaciones:

- Muchas muestras que contienen bacilos tuberculosos recuperados por cultivo, son negativas al examen en frotis debido a la baja sensibilidad del método, relacionada en parte al número de microorganismos presentes. Por ello, es fundamental por lo menos, obtener tres muestras de esputo para baciloscopía obtenida en días intermitentes.
- Es difícil distinguir los bacilos ácidorresistente de los artificios de coloración, por lo que es necesario, utilizar siempre portaobjetos nuevos para cada frotis y personal entrenado en baciloscopía.
- El portaobjeto se debe examinar siguiendo un esquema de guarda griega tal como se muestra en la figura.
- Principalmente deben observarse los límites externos del preparado, debido a que durante la preparación del extendido, generalmente se realiza un movimiento centrífugo (de adentro hacia afuera del portaobjeto) que ubica las micobacterias en los bordes del frotis.

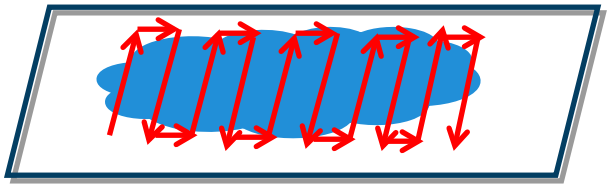


Figura 4. Método de observación microscópica

La búsqueda se realiza con objetivo de inmersión y las micobacterias se observan como bacilos teñidos de rojo o fucsia contra un fondo azul.

La observación debe ser cuantitativa (número de bacterias por campo microscópico) y se deben recorrer 200 campos para recién dar por negativos los frotis.

Informe de laboratorio para BAAR (Bacilo Acido Alcohol Resistente): Ver consenso Tabla 1: Modelo de informe de esputo y/o aspirado traqueal.

Procesamiento y cultivo

El mejor rendimiento de los cultivos se obtiene al descontaminar previamente las muestras de esputo.

Procedimiento de descontaminación, homogenización y concentración

1. Agregar al esputo NaOH (al 4% estéril) v/v.
2. Incubar a 35ºC durante 20 minutos con agitación cada 10 minutos.
3. Centrifugar a 2000 rpm/min durante 20 minutos.
4. Neutralizar el sedimento con HCl (1 N estéril), previo agregado de rojo fenol (pH 6,8 a 7,4). Tener cuidado con este paso, la neutralización se ha completado a la primera gota de HCl que produce un viraje a amarillo del indicador.

El hidróxido de sodio, el digestivo más comúnmente usado, cumple la función de descontaminar las muestras y además licuar las secreciones, pero también es nocivo para los bacilos tuberculosos, por lo que *el tiempo de descontaminación es fundamental*, dado que a los 60 minutos mueren el 80% de los BAAR presentes en la muestra.

Las muestras obtenidas asépticamente como las quirúrgicas, líquido cefalorraquídeo, sinovial u otros líquidos internos del organismo, usualmente no requieren descontaminación.

El esputo o los tejidos de autopsia, sí la requieren.

Siembra

Por su elevada sensibilidad el cultivo es la técnica de oro en el diagnóstico de tuberculosis, requiere la presencia de 1 a 10 bacilos en toda la muestra y permite el aislamiento, la identificación del germen y las pruebas de sensibilidad posteriores.

El medio sólido recomendado para cultivo es el Lowenstein-Jensen. Este medio contiene básicamente: huevos enteros frescos, sales definidas, glicerol, harina de papas y verde de malaquita como agente bacteriostático.

Otros medios utilizados son: Stonebrink también en base a huevos y el el Middlebrook 7H10 en base a agar. Se encuentran disponibles varios medios líquidos entre ellos: Dubos y el Middlebrook 7H12.

Actualmente los métodos automatizados como el BACTEC MGIT 960 (de referencia), utilizan medio líquido y un revelado de desarrollo bacteriano por fuorescencia permitiendo en 1 – 2 semanas obtener resultados positivos. Los negativos se observan hasta 42 días.

Utilizando medios sólidos por cultivo convencional, se recomienda sembrar en 3 a 5 tubos con medio en plano inclinado y tapón de algodón, 150 µl del sedimento, obtenido en el proceso de descontaminación. Incubar en estufa a 35ºC. A las 48 a 72 horas, cuando desaparece el líquido, agregar tapones de goma o rosca a los tapones de algodón, previo quemado e insertado de los mismos dentro del tubo (con pinza). Continuar la incubación.

El agregado de tapones de goma o caucho, se realiza para evitar la deshidratación del medio de cultivo, por el largo tiempo que se incubarán a 35ºC.

Se realizan controles semanales hasta observar desarrollo.

En caso de que éste no se produzca, incubar por lo menos 60 días antes de considerarlos negativos.

Para la identificación de los aislamientos y estudio de la sensibilidad antimicrobiana correspondiente, enviar las cepas a Centros de Referencia.

Nuevas tendencias en diagnóstico de tuberculosis

Técnicas de diagnóstico molecular están disponibles y permiten la identificación del complejo *M. tuberculosis* sin necesidad de cultivo a través de la amplificación de material genético del bacilo de Koch de las muestras por PCR e identificación por hibridación de sondas de ADN. La altísima sensibilidad exige trabajar solamente con muestras que tengan baciloscopía positiva, para evitar falsos positivos.

Bibliografía consultada

Andrés Martín A; Moreno Perez D; Alfayate Miguélez S; Couceiro Gainzo J; García García M; Korta Murua J: Etiología y diagnóstico de la neumonía adquirida en la comunidad y sus formas complicadas. *An Pediatr (Barc).* 2012; 76(3): 162. e1---162. e18.

Asociación Argentina de Medicina Respiratoria. Consenso Argentino de Tuberculosis. 2009.

Ballester D. Tuberculosis: Normativas para el diagnóstico microbiológico. Guías y Recomendaciones. Asociación Argentina de Microbiología. 2009.

Cacho Calvo, J; Meseguer Peinado, M; Oliver Palomo, A; Puig de la Bellacasa J: Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Infectología y Microbiología Clínica (SEIMC). 2007.

Comité Nacional de Neumonología y Comité Nacional de Infectología. Tuberculosis infantil. Modificaciones a los criterios de diagnóstico tratamiento de la tuberculosis infantil. *Arch Argent Pediatr.* 2007; 105(1): 54-55.

Comité Nacional de Neumonología, Subcomisión de Epidemiología, Comité Nacional de Infectología, Comité Nacional de Medicina Interna. Recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de las infecciones respiratorias agudas bajas en menores de 2 años. *Arch. argent. pediatr*. 2006; 104(2): 159-176.

González- Martín, J; García García, J; Anibarro, L; Vidal, R; Esteban, J; Blanquer, R. et al. : "Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis". *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28(5): 297. e1–297.e20.

Guillén, R; Franco, RI; Franco, L; Moraga, P; Ojeda, M; Russomando, G. : Detección por PCR múltiple de gérmenes atípicos en pacientes con neumonía adquirida de la comunidad que concurrieron al INERAM. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 2012; 10(1): 24-35.

Hospital Muñiz-Instituto Vacarrezza. *Guías de diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis*. 2011.

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Dr. E. Coni". Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. *Normas Técnicas*. 2013.

Kadioglu EE; Ucar EY; Araz O; Aktas E; Saglam L: A comparison of two different culture methods for use in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Eurasian J Med.* 2014; 46(2): 74-7. doi:10.5152/ eajm.2014.19.

Koneman EW, Winn WC (h.), Allen SD, Janda WM, Procop GW, Schreckenberg PC. *Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas en color*. 6th Edición. Ed. Médica Panamericana. 2008.

Ministerio de Salud Pública. Presidencia de la Nación. *Enfermedades Infecciosas. Diagnóstico de Tuberculosis. Guías para el Equipo de Salud*. 2009.

Lean M et al. Rapid Diagnostic Tests for Group A Streptococcal Pharyngitis: A Meta-analysis. Pediatrics. 2014; 134: 4, 771-781.

Lopardo G, Calmaggi A, Clara L, Levy, Hara G, Mykietiuk A *et al.* Consenso sobre Diagnóstico y Tratamiento de Infecciones de Vías Respiratorias Altas. MEDICINA (Buenos Aires) 2012; 72: 484-494.

Luna C. *Neumonía adquirida en la comunidad*. Asociación Argentina de medicina Respiratoria. 2007.

Reinier Borrero, Nadine Álvarez, Fátima Reyes, María Elena Sarmiento, Armando Acosta: *Mycobacteriumtuberculosi*s: factores de virulencia. Instituto Finlay. Centro de Investigación – Producción de Vacunas. Ave. 27 No. 19805, La Lisa. Ciudad de La Habana, Cuba AP. 16017, CP11600. VacciMonitor 2011; 20(1): 34-38.

Shulman ST, Bisno AL, Clegg HW, Gerber MA, Kaplan EL, Lee G. Clinical practice guideline for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis: 2012 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 15; 55(10): e86-102. doi:10. 1093/cid/cis629.

Sociedad Latinoamericana de Infectología Pediátrica. Consenso de la Sociedad Latinoamericana de Infectología Pediátrica (SLIPE) sobre Epidemiología del Neumococo en Latinoamérica. 2012.

Solomons RS, Visser DH, Friedrich SO, Diacon AH, Hoek KG, Marais BJ: Improved diagnosis of childhood tuberculous meningitis using more than one nucleic acid amplification test. Int J Tuberc Lung Dis. 2015 Jan; 19(1): 74-80. doi:10. 5588/ijtld.14.0394.

Tuberculosis 2005. Todar's Online Textbook of Bacteriology. www. textbookofbacteriology.net.

Vergara M, Quiroga M, Pegels E, Oviedo P., Laczeski M. *Guías para el diagnóstico en bacteriología Clínica*. Posadas, EdUNaM, 2009.

Vergara Marta y cols.: *Las Infecciones Bacterianas y el Laboratorio de Bacteriología.* Posadas. EdUNaM. 2009.

CAPÍTULO 5
Infecciones de Piel y Partes Blandas (IPPB)

Las bacterias y la virulencia ■ marta vergara

La población bacteriana residente de la piel está conformada por millones de bacterias que la protegen y que mediante su autorregulación constituyen la llamada microbiota normal, o población microbiana normal, la que impide además el establecimiento de microorganismos nocivos.

Entre las funciones de estos microorganismos residentes en la piel está, además de la de contribuir a la defensa contra infecciones, la de colaborar en la degradación de los lípidos de la superficie cutánea constituyéndose en una barrera de importancia ante agresiones externas.

Esta microbiota de la piel se localiza en la superficie, estrato córneo, glándulas sebáceas y folículos pilosos.

La armoniosa relación entre esta microbiota y la piel se rompe sólo cuando la piel es herida o las defensas del huésped están disminuidas.

El conocer esta microbiota y su función es de importancia a la hora de comprender la patogenia de algunas enfermedades.

Desde sus primeras horas de vida, el hombre es colonizado por microorganismos que vivirán en simbiosis en la piel, en el tracto respiratorio alto, digestivo y en muchos otros tejidos, constituyendo la llamada población microbiana residente.

Los microorganismos que componen esta población residente se mantienen en un sitio dado, a determinada edad del hombre. Se encuentran como constituyentes dominantes de la piel y sobreviven adheridos a la superficie cutánea.

Otros microorganismos no patógenos o potencialmente patógenos, que se establecen en la piel o mucosas desde el medio ambiente, pero no tienen capacidad de adherir, se llaman transitorios.

Si la microbiota residente no sufre alteraciones, la transitoria no tiene importancia clínica.

En cambio si sufre algún tipo de alteración, los microorganismos transitorios pueden colonizar, multiplicarse y producir enfermedades.

Si la población microbiana residente es suprimida o sus microorganismos son introducidos en la circulación sanguínea, ellos se vuelven patógenos.

Los estafilococos y bacilos grampositivos aerobios y anaerobios constituyen el grupo mayor de los miembros de la microbiota residente. El grupo menor lo constituyen los micrococos, algunos acinetobacters y algunos hongos y parásitos.

También existe una microbiota transitoria compuesta por *Streptococcus* del grupo A (SGA) algunas neiserias y algunas cándidas.

Staphylococcus aureus (SA), un patógeno potencial, se encuentra con frecuencia en cara y manos de aquellos individuos portadores nasales de la bacteria, como se verá más adelante.

La microbiota de la piel desempeña varias funciones: en la homeostasis, en la defensa contra las infecciones y también actúa en la degradación de lípidos promoviendo la función de barrera, tanto mecánica como química, contribuyendo a asegurar su integridad.

Esta integridad de la barrera cutáneo-mucosa, es la primera línea de defensa contra las infecciones. Cualquier deterioro de los mecanismos de la defensa humoral o celular, facilitará la llegada de microorganismos desde la piel, dada su exquisita irrigación, hacia otros órganos, hasta diseminarse a sitios remotos.

Diversas estructuras de la piel se ven comprometidas en infecciones de severidad y compromiso diverso dependiendo dicho compromiso de la estructura afectada.

Las llamadas infecciones primarias son las que se originan en la piel sana con puerta de entrada visible o no. Las que tienen origen en sitios distintos de la piel y afectan a ésta en segundo término, se conocen como infecciones secundarias.

Las infecciones leves: son aquellas que tienen generalmente un manejo médico, como impétigo, forúnculos, erisipela, ectima. Son infecciones que presentan evolución y pronóstico bueno a diferencia de las llamadas infecciones graves que se presentan en huéspedes comprometidos con

compromiso sistémico, pérdida de estructuras anatómicas, y aun aquellas que ponen en riesgo la vida del paciente, como la fascitis necrotizante y la mionecrosis clostridial.

Desde el punto de vista de las regiones afectadas, se conocen como superficiales, aquellas que afectan la epidermis y la dermis y como profundas, las que comprometen la grasa subcutánea, la fascia y el músculo.

Sean infecciones leves o graves, si no conducen a la destrucción de los tejidos, se las denominan no necrotizantes y como necrotizantes cuando las infecciones llevan a la destrucción de las estructuras involucradas, sean todas las capas de la piel, tejido celular subcutáneo, fascia, músculo y aun órganos y cavidades.

Si bien se consideraba que en la mayoría de las infecciones no necrotizantes, el manejo es médico y muy raramente de laboratorio microbiológico, actualmente este concepto comienza a modificarse desde la emergencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en la comunidad (SAMR-CA) que portan personas sanas de la comunidad y que pueden comprometer infecciones de piel y partes blandas, neumonía necrotizante y otras severas infecciones.

Las infecciones necrotizantes, consideradas una emergencia médica, requieren de la clínica y la cirugía, tal el ejemplo de la fascitis necrotizante, conocida como la provocada por las "bacteria come carne o devoradora de carne" que es una infección bacteriana que se propaga rápidamente y destruye el tejido blando del cuerpo. Esta enfermedad puede ser producida, además de SGA, *Klebsiellas* spp*., Clostridium* spp*., E coli,* SA y *Aeromonas hidrophila*.

Por lo general, las infecciones bacterianas producidas por SGA son de clínica leve a moderada y de tratamiento exitoso y no dificultoso. No ocurre ésto en la fascitis necrotizante, donde las toxinas producidas por SGA, en algunas situaciones, destruyen el tejido que infectan, de allí su denominación de "necrosante" que significa que causa la muerte del tejido. En estas situaciones el diagnóstico preciso, el tratamiento inmediato y la intervención quirúrgica son de vital importancia.

La mayoría de los microorganismos involucrados en infecciones de piel y partes blandas participan en las formas más leves y hasta en las más severas de ellas, y ponen en juego diversos factores de virulencia según el grado de severidad, localización y extensión de las lesiones que provocan.

Además de factores del huésped, del microorganismo, de la puerta de entrada, que deben ser tenidos en cuenta para el diagnóstico y tratamien-

to de estas infecciones, otros, como los factores epidemiológicos, requieren ser jerarquizados.

Infecciones ocurridas en pacientes hospitalizados deben ser estudiadas cualquiera sea su presentación clínica, ya que su etiología no es predecible.

Merecen idéntica consideración situaciones como el frecuente contacto con agua de ríos, como es el caso de nuestra provincia, Misiones, surcada por más de 600 cursos de agua, donde *Aeromonas hydrophila* es un agente etiológico a tener en cuenta.

En general en las infecciones de curso grave encontramos a SA, SGA**,** bacilos gramnegativos aerobios y bacilos grampositivos anaerobios como *Clostridium perfringes*, como los principales responsables en diversas localizaciones.

El impétigo, lo produce SA y su toxina exfoliativa está involucrada en el impétigo bulloso. También SGA puede ser el responsable.

Si bien SA es el principal involucrado en la foliculitis (pápulas y pústulas) y se encuentran asociados también enterobacterias, *Candida* spp., *Pseudomonas aeruginosa,* como microorganismos frecuentes.

En el caso de la erisipela, donde ya existe un compromiso más profundo, es por lejos el SGA el responsable principal de estos cuadros, donde también pueden recuperarse otros estreptococos e incluso SA.

En el caso de la celulitis, SGA y SA son sus principales agentes etiológicos y con menor frecuencia están involucrados *Streptococcus* (grupos G, C y B), *H. influenzae* y otros bacilos gramnegativos.

En general, en celulitis, foliculitis, abscesos y úlceras, SA, bacilos gramnegativos aerobios y a veces algunos anaerobios, son los principales responsables.

Como vimos en párrafos anteriores SA está fuertemente involucrado en las lesiones no necrotizantes como impétigo, ectima, foliculitis, forúnculos, celulitis, diversos abscesos y úlceras y SGA puede estar involucrado en el impétigo y el ectima, pero es el principal responsable de la erisipela, la celulitis y la fascitis necrotizante.

> **Es importante tener presente que: en las infecciones graves y profundas, con necrosis tisular severa, son SA, SGA, bacilos gramnegativos y grampositivos, aerobios y anaerobios y cocos grampositivos anaerobios, los responsables.**

Streptococcus pyogenes- grupo A (SGA)

Fue en 1874 que Billroth lo describe a *Streptococcus pyogenes* en casos de erisipela y de infecciones de heridas, tanto cutáneas y sistémicas.

Ya vimos que las infecciones producidas por SGA son las enfermedades infecciosas más frecuentes y que la bacteria coloniza la orofaringe de los niños y adultos jóvenes entre 15 y 20% de ellos.

El encuentro inicial de SGA con las superficies de los epitelios del huésped ocurre en la faringe o la piel, microorganismo que siempre fue considerado un patógeno extracelular el que producirá daño cuando las defensas están comprometidas o cuando ellos son capaces de penetrar las defensas constitutivas del huésped.

SGA es el responsable de la causa bacteriana más frecuente de faringitis aguda y también de infecciones cutáneas y sistémicas. Produce un amplio rango de enfermedades desde no severas hasta severas e invasivas, como el síndrome de shock tóxico y la fascitis necrotizante.

En nuestro país las enfermedades invasivas por SGA son de notificación obligatoria.

Las características microbiológicas de este microorganismo y la de muchos de los factores de virulencia, asociados a la célula bacteriana y secretados por ella, a los que recurre para adherir, invadir y causar el daño, se comentan en **Capítulo 1 y 4**.

El acceso a los antimicrobianos, penicilina en especial, ha revertido la abrumadora mortalidad en puérperas por infecciones por esta bacteria. Además de los antimicrobianos, el mejoramiento de la calidad sanitaria y socio económica de la población, fue determinante.

Sin embargo, hacia fines de 1985, aparecen numerosas publicaciones dando cuenta de la aparición de severas enfermedades, asociadas a shock, con síndrome similar al shock tóxico, con fiebre, hipotensión y falla multiorgánica. Aparecieron así casos de sepsis por SGA, fiebre reumática y un síndrome semejante al síndrome de shock tóxico descrito por *Staphylococcus*.

Es probable que el uso de drogas intravenosas y el aumento en la virulencia de SGA (el que continua con excelente sensibilidad a la penicilina, su tratamiento de elección) que involucra a potentes exotoxinas, influyen en esta situación donde jóvenes y adultos jóvenes son los más afectados.

Se identifican como factores de riesgo de mortalidad a: coma- shock- bacteriemia sin causa identificada- alcoholismo- enfermedades subyacentes como diabetes y EPOC- y edad avanzada entre otros.

El camino al Daño

Recordamos, que el encuentro inicial de esta bacteria con el huésped se da en las superficies epiteliales de la faringe o de la piel.

Diversas proteínas de la bacteria, que tienen como receptor a la fibronectina, han sido implicadas en la adherencia al tracto respiratorio alto y la proteína M ha sido implicada en la adherencia a las células de la piel.

Ya revisamos que desde la colonización del tracto respiratorio alto y la faringitis aguda, los estreptococos desarrollan variadas estrategias para diseminarse a otros sitios del huésped, ya sea al tracto respiratorio alto o bajo y conducir a la infección de oído medio, sinusitis, neumonía o a sitios más remotos por vía sanguínea como la meningitis.

Desde la bacteria en sangre, puede conducir a osteomielitis, artritis, y otras severas infecciones como la ya mencionada fascitis necrotizante.

Especial interés tienen en estas infecciones: las enzimas secretadas- la proteína M de utilidad en la adherencia y en la resistencia a la fagocitosis- proteínas de unión a la fibronectina comentadas antes- el ALT y las exotoxinas pirógenas, que le permiten adherir, colonizar y causar enfermedades invasivas de severidad.

Las tres exotoxinas reconocidas como exotoxinas pirógenas estreptocócicas (SPE) (conocidas antes como toxinas eritrogénicas por ser responsables de la erupción roja de la escarlatina), pertenecen a tres tipos: A B y C. Son responsables además de la fiebre, exantema y enantema en la escarlatina, así como de la sepsis y del síndrome de shock tóxico.

Las enterotoxinas estafilocócicas, las exotoxinas pirógenas estafilocócicas y las toxinas del síndrome de shock tóxico son miembros de la misma familia de las SPE, tienen propiedades biológicas, bioquímicas y mecanismos de acción semejantes.

Estas SPE que actúan como superantígenos provocan una liberación de grandes cantidades de citoquinas y son responsables en la producción de miositis, escarlatina, fascitis necrotizante, síndrome de shock tóxico (SST) y de la intoxicación alimentaria por *Staphylococcus*. También aumentan la susceptibilidad del huésped al shock endotóxico letal. Interactúan con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II, evitando un procesamiento previo activando masivamente a células T, desencadenando una acelerada cascada de citocinas inflamatorias que causan daño. Potencian los efectos biológicos de la endotoxina de las bacterias gramnegativas, estimulando a los macrófagos e inducen la síntesis de fac-

tor de necrosis tumoral α (FNTα) y de interleuquinas, mediadores en la aparición de la fiebre, injuria tisular y shock.

Son proteínas bacterianas que estimulan el sistema inmune más intensamente que las proteínas comunes.

Como consecuencia de la acción de estas citoquinas ocurre la muerte de los tejidos (por falta de oxígeno y pérdida de líquido) por el daño a las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos.

El daño tisular se agrava por la producción, además de las SPE, de una enzima, la cisteína proteasa, involucrada también en la destrucción tisular.

Las enzimas estreptoquinasa, ADNasa y hialuronidasa favorecen la proliferación tisular de la infección.

También la estreptolisina O (SLO) ha sido implicada en daño tisular ya sea actuando sola o en combinación con las otras toxinas. La acumulación de leucocitos polimorfonucleares (PMN), tanto en el pulmón como en los tejidos, en el SST, ha sido atribuido también a la SLO.

La SLO promueve el incremento de citoquinas proinflamatorias como la IL-1β, el FNT α y diversos leucotrienos. Recientes evidencias dan cuenta de ello. Todas estas toxinas sirven como inmunomoduladores del sistema de defensa del huésped.

Este incremento en enfermedades invasivas se asoció al serotipo M1, altamente virulento y diseminado en todo el mundo y en algunas situaciones, como el shock tóxico, al serotipo M3 que producen las exotoxinas pirógenas A o B o ambas.

Se cree que la capacidad de SGA para invadir y sobrevivir dentro de la célula eucariótica, le posibilita, no solo evadir los mecanismos de defensas del huésped, sino también la acción de antimicrobianos.

Staphylococcus spp.

Los estafilococos fueron descriptos por Robert Koch en 1878 y también fue el primero en describirlo en una muestra de pus humano.

En 1880 Luis Pateur los cultiva en medio líquido y en 1882 fue Sir William Ogston demostró su patogenicidad en ratón y cobayo.

Staphylococcus aureus (SA) colonias color amarillo dorado y *Staphylococcus albus,* colonias color blanco, fueron descriptas por Rosenbach en 1884.

Luego de varias investigaciones sobre sus características antigénicas, recién en la década del 60 y principio de los 70 se demuestra el carácter de patógenos oportunistas de los estafilococos coagulasa negativa(ECN).

SA pertenece al género *Staphylococcus* de la familia *Micrococcaceae.*

Las especies, *aureus, epidermidis y saprophyticus* son las especies de mayor significancia clínica.

Siguiendo las indicaciones del Manual de determinaciones bacteriologicas Bergey 9ª edición, estas bacterias se ubican de la siguiente manera:

Grupo 17 : Cocos Gram positivos
Género: *Staphylococcus*

El género *Staphylococcus* está compuesto por 32 especies de las cuales 17 están asociadas a patología humana.

Entre los estafilococos coagulasa positiva asociada a patología humana podemos mencionar también a *Staphylococcus schleiferi* involucrado en infecciones de material protésico, empiema cerebral, osteítis vertebral, y meningitis en pacientes con válvulas de derivación de LCR y otras infecciones de heridas.

Entre los estafilococos coagulasa negativa (ECN) asociados a patología humana: *S. epidermidis, S. haemolyticus y S. saprophyticus* spp. *S. lugdunensis, S. warneri, S. hominis* spp. *S. auricularis, S. capitis* y otros.

Especie tipo: *Staphylococcus aureus* (SA) .

Dado que la mayoría de las cepas patógenas producen un pigmento amarillo dorado, se lo denominó SA, como modo de diferenciarlo de los estafilococos menos patógenos productores de colonias blancas.

Como vimos en general SA forma colonias amarillas pigmentadas y *S. epidermidis* forma colonias pequeñas blancas. A pesar de lo comentado, se sabe que la producción de pigmento es un rasgo variable de los estafilococos y su correlación con la patogenicidad no siempre es certera.

Es la producción de coagulasa la característica que identifica, en la mayoría de los casos, a un SA, sean o no pigmentadas sus colonias.

SA es un patógeno de importancia en las infecciones humanas y de animales y coloniza principalmente las fosas nasales y puede ser encontrado regularmente como habitante de otros sitios del organismo. Su distribución es mundial.

Los estafilococos son cocos grampositivos inmóviles, que se disponen en pares, tétradas, cadenas cortas y racimos (del griego *staphyle*, racimo de uvas). Las células individuales miden alrededor de 0.8 a 1 μm de diámetro.

Son bacterias anaerobias facultativas catalasa positiva y oxidasa negativa. Pueden crecer a temperaturas entre 15º C a 45ºC y a una concentración de NaCl de hasta 15%.

SA es frecuentemente hemolítico en agar sangre mientras que *S. epidermidis* no presenta hemólisis. La aparición de las colonias en los estafilococos se produce a las 24 a 48 hrs.

SA puede desarrollar en forma pobre, tardía, a partir de los 4 a 5 días, en medios de cultivo habituales como agar sangre y lo hace en forma de colonias pequeñas, puntiformes, llamadas variantes puntiformes o SCV (Small Colony Variants). Estas colonias, además de su lento crecimiento, se caracterizan por la ausencia o pérdida de la pigmentación y de la beta hemólisis y por tener un metabolismo alterado lo que imposibilita el diagnostico por algunas pruebas como la beta hemólisis, la coagulasa y la utilización del manitol.

Pueden desarrollar en placas de agar sangre con un aspecto de "huevo frito". Estas SCV se deben investigar en infecciones persistentes de larga evolución, como las infecciones osteoarticulares, fibrosis quística, y en general infecciones asociadas a dispositivos protésicos.

Estas SCV han sido descriptas además de en SA sensible y resistente a la meticilina en una amplia variedad de géneros y especies bacterianas, como microorganismos implicados en infecciones comunitarias y hospitalarias como *S. epidermidis, Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacia, Salmonella* spp. *E.coli, Serratia marcescens y Neisseria gonorrhoeae.* Se trata además de variantes hipermutables, lo que favorece la adquisición de resistencia.

En cuanto al cultivo y desarrollo de estas variantes, algunas dependen del CO_2, por lo que algunos autores sugieren cultivos en dicha atmósfera a fin de detectarlas.

También sucesivos subcultivos logran revertir a colonias normales a las SCV.

Las SCV no desarrollan en cualquier medio de cultivo usado en el laboratorio, como tampoco en los sistemas comercializados para cultivos y pruebas de sensibilidad.

Se especula que la exposición prolongada a aminoglucósidos favorece la selección de SCV en SA dependientes de hemina y menadiona, como en aquellas dependientes de timidina, la exposición prolongada a trimetoprim sulfametoxazol logra dicha selección.

Las SCV de SA son las más estudiadas y descriptas.

SA es una de las principales causas de infecciones nosocomiales, asociadas con prótesis. Causa una variedad de infecciones supurativas y toxigénicas en humanos, como infecciones de PPB, bacteriemias, neumonías, infecciones osteoarticulares de difícil erradicación y tratamiento, endocarditis, mastitis en humanos y en rumiantes, también de difícil erradicación y tratamiento, síndrome de la piel escaldada, diarrea enterotoxigénica asociada a alimentos y el sindrome de shock toxico (SST) por liberación de las exotoxinas pirógenas en la corriente sanguínea.

A excepción de tres situaciones donde se reconocen los determinantes de patogenicidad como:

- en el SST, por las toxinas pirógenas 1 del síndrome de shock tóxico (TSST-1).
- en la intoxicación alimentaria por la ingestión de toxinas preformadas en el alimento.
- en el síndrome de piel escaldada por las toxinas exfoliativas.

El SA es un patógeno oportunista multifactorial.

La patogenia de este microorganismo se explica por la cantidad de factores estructurales y no estructurales que funcionan como factores de virulencia para producir diversas patologías de variada severidad.

Muchos de estos factores de virulencia se expresan por genes que se regulan eficientemente por un exquisito sistema regulatorio, expresándose en el momento adecuado, cuando la bacteria lo necesita, disminuyendo gasto de energía.

Entre ellos, los más importantes:

- Factores estructurales, asociados al soma bacteriano, a las envolturas:
- acidos teicoicos: grupo de polímeros que contienen fosfato. Su esqueleto es una secuencia de ribitol fosfato. Se comportan como inmunógenos. Representan alrededor del 40% del peso de la pared celular. Unos están unidos al peptidoglicano y otros a la pared celular bacteriana.
- proteínas de superficie que promueven la colonización a los tejidos del huésped como la proteina A : es incorporada en forma covalente a la capa externa de peptidoglicanos.
- peptidoglucano: componente básico de la pared celular de SA que confiere forma y estabilidad al microorganismo y representa el 50% del peso de la pared.
- adhesinas

(MSCRAMMs) (componentes de superficie microbiana que reconocen moléculas de adhesión de la matriz), involucra una serie de adhesinas que se encuentran en la superficie bacteriana, como por ejemplo la proteína de unión a fibronectina.

El peptidoglucano, de importancia en la respuesta del microorganismo frente a antimicrobianos como los betalactámicos, es también el soporte de anclaje de MSCRAMMs, por lo que actúa indirectamente en la patogenia.

Dado que también el peptidoglucano es reconocido por el sistema inmune del huésped, desencadenando una respuesta inflamatoria, el germen lo oculta, ya sea mediante la producción de sustancias como la proteína A o incluso mediante la cápsula.

- Factores que secreta la bacteria en algún momento durante su vida:
  - hemolisinas- leucocidinas-hialuronidasa-enterotoxinas (TSST-1) (superantígeno)
  - proteasas-proteína A- lipasas-ribonucleasas-toxinas exfoliativas A y B(superantígenos)-cápsula.

La cápsula es un elemento muy raro en los estafilococos. Como veremos más adelante, la capsulación in vivo es un fenómeno frecuente que además confiere a la bacteria una ventaja antifagocitaria adicional. Muchas cepas de SA están recubiertas por una capa de polisacárido que se comporta como una cápsula de estructura ligeramente más laxa, que posee diversos componentes capaces de interrelacionarse con el huésped.

La coagulasa: no se trata de una enzima, es una proteína extracelular que se une a la protrombina y la reacción que produce permite identificar a SA. Funciona como un sistema protector de la bacteria contra las defensas del huésped.

β-lactamasa -catalasa-leucocidina de Panton- Valentine

Muchos de estos factores funcionan como:

- invasinas que promueven la diseminación bacteriana en los tejidos
- evasión de la fagocitosis, por la producción de catalasa
- componentes inmunológicos (proteína A, coagulasa)
- toxinas que lisan las membranas de las células eucarióticas (hemolisinas, leucocidinas, leucotoxinas).
- exotoxinas que dañan los tejidos del huésped.

SA es una bacteria con gran capacidad de adaptación y gran capacidad para sobrevivir en el huésped animal. Tiene especial capacidad de unir-

se, por receptores proteicos, a las proteínas específicas de la matriz extracelular de mamíferos y romper barreras normales en los tejidos para unirse a las membranas basales.

Importante este mecanismo en la génesis de la osteomielitis, demostrado por la capacidad de la bacteria para unirse a la matriz ósea mediante dichos receptores: (fibronectina, laminina, sialoglicoproteínas y colágeno), ayudado este proceso por la capacidad de la bacteria de sobrevivir en forma intracelular, con estado metabólico alterado, lo que explicaría la persistencia prolongada de la infección.

Luego de la invasión, son liberadas muchas citoquinas que participan en la destrucción y neoformación ósea. Los leucocitos PMN provocan la liberación de oxígeno y enzimas proteolíticas que lisan tejidos. La necrosis del hueso se produce por obstrucción vascular por contenido inflamatorio con importante secuestro (desvascularización).

Algunas cepas de SA producen un exapolisacárido que les permite adherirse a catéteres, prótesis implantadas y válvulas cardíacas, entre otras estructuras. La producción de estos exopolisacáridos, (sustancia extracelular, "slime") **(Capítulo 1)** ha sido señalada también en los estafilococos coagulasa negativos, como *S. saprophyticus*, *S.epidermidis* y otros y en algunos bacilos gramnegativos. El slime posibilita a la bacteria escapar de la acción destructora de PMN mediada por el complemento y lograr diseminarse por los tejidos.

Importante el slime en los estafilococos coagulasa negativos que también colonizan dispositivos artificiales como catéteres intravasculares, o del tracto urinario o prótesis al favorecer la adherencia y protegerlas de la llegada de antimicrobianos.

SA es considerado siempre un patógeno potencial, mientras la mayoría de las cepas de *S. epidermidis* son no patógenas y pueden eventualmente jugar un papel importante como protectores del huésped, al ser constituyentes de la población microbiana normal.

S. epidermidis se asocia con infecciones adquiridas en el hospital, en especial en pacientes con susceptibilidad aumentada y en aquellos que portan un cuerpo extraño como una prótesis. En la peritonitis secundaria a catéteres de diálisis peritoneal, es el principal agente recuperado. Se los reconoce primariamente asociados a infecciones nosocomiales con cepas de la propia población microbiana del paciente (contaminación endógena) o del personal de salud (contaminación exógena). Es por todo ello un microorganismo oportunista que causa enfermedad en el huésped hospitalizado y de la comunidad.

En general los ECN constituyen parte de la microbiota residente en piel y mucosas de humanos y animales.

Además de *S. epidermidis* las especies más involucradas en cuadros de infecciones humanas incluyen a *S. saprophyticus, S. haemolyticus, S. lugdunensis, S. hominis, S. simulans, S. capitis*, entre otros.

El camino al Daño

Una vez que ha colonizado, mediante las adhesinas proteicas (el ácido teicoico parece estar involucrado en la activación del complemento y en la adherencia a las mucosas), SA dispone de una variada cantidad de enzimas hidrolíticas, para una amplia también variedad de sustratos, que le posibilitan iniciar la invasión.

Para la invasión y la acción tóxica:- enzimas hidrolíticas, lipasas, proteasas, coagulasa, estafiloquinasas, nucleasas y otras que facilitan el establecimiento en piel y en membranas mucosas del huésped.

- Las lipasas, enzimas lipídicas hidrolizantes. Tienen variados sustratos, entre ellos, el plasma y las grasas que se acumulan en la superficie del organismo. Ello explica la intensa colonización de estos microorganismos en áreas sebáceas y la invasión de tejidos cutáneos y subcutáneos. La producción de lipasa in vitro, está directamente relacionada a la capacidad de producir forúnculos.
- La α (alfa) toxina: es la mejor caracterizada y la más potente toxina que daña las membranas. Los eritrocitos son las células más sensibles a esta toxina. Actúa también sobre leucocitos, plaquetas, fibroblastos y células Hela.

  Esta toxina rompe lisosomas y es citotóxica potente para macrófagos humanos y plaquetas, contribuyendo intensamente al daño de los tejidos después del establecimiento de un proceso infeccioso.
- La β (beta) toxina: es una esfingomielinasa que daña las membranas ricas en este lípido. Es activa también sobre eritrocitos, leucocitos y fibroblastos humanos.
- La δ (delta) toxina: es un pequeño péptido producido por la mayoría de las cepas de SA y es una formadora de poros.
- La γ (gamma) toxina: compuesta por dos componentes proteicos que actúan sinérgicamente para dañar las membranas, lisando eritrocitos. Actúa casi exclusivamente sobre células fagocíticas humanas y de co-

nejo, de importancia en la patogenia, pues es una formadora de poros en dichas células.

La α, β, γ, y δ toxinas se encuentran en la mayoría de las cepas de SA. Son codificadas cromosómicamente y su producción está regulada por un sistema de autoinducción, el *agr,* que se comenta más adelante.

- La toxina exfoliativa: esta toxina es también un superantígeno y produce la lisis de las uniones intracelulares entre las células de la epidermis, siendo responsable del sindrome de piel escaldada, enfermedad potencialmente letal, principalmente en niños recién nacidos y que causa el descascaramiento de la piel. Es también mitógena sobre las células T.
- La leucocidina de Panton- Valentine (LPV): ataca destruyendo sólo los leucocitos polimorfonucleares, monocitos y macrófagos, por lo que media en la necrosis tisular.

Esta toxina ha sido asociada con infecciones de piel y tejidos en diversas localizaciones y severa neumonía necrotizante en adultos jóvenes y niños sanos. En los leucocitos, la principal acción se centra en alteración de la permeabilidad a los cationes. Es una toxina formadora de poros.

Las enterotoxinas

SA secreta dos tipos de toxinas con actividad de superantígenos: las enterotoxinas de las cuales se conocen seis tipos antigénicos, llamadas A, B, C, D, E y G y la toxina del sindrome de shock tóxico (TSST) que se asocia a fiebre, shock y falla multiorgánica. Son superantígenos de la familia de las enterotoxinas, como las SPE de SGA comentadas antes.

La intoxicación alimentaria por las enterotoxinas estáfilococicas provoca un intenso peristaltismo intestinal, por probable acción directa de la toxina sobre el centro del vómito del cerebro, provocando además diarrea y vómitos en el hombre.

Para la resistencia a las defensas del huésped:- proteína A, coagulasa, leucocidinas, hemolisinas, catalasa, cápsula.

- La proteina A: antígeno específico de grupo de la pared celular que, al consumir complemento, protege al germen de la opsonización.-La proteína A, se encuentra unida al peptidoglucano en la pared celular. Es un antígeno específico privativo de SA, interactúa con la IgG nor-

mal de la mayoría de los mamíferos. A diferencia de la reacción Ag-Ac solo está unida a la porción Fc, no a la porción Fab, de la IgG. Si bien la unión de la proteína A y la fracción Fc es inespecífica, actúa como un complejo antígeno- anticuerpo por cuanto activa el complemento por la vía clásica. Es por ello que la proteína A es quimiotáctica, anticomplementaria, antifagocítica y provoca reacción de hipersensibilidad y lesión de plaquetas. Potencia la actividad destructora de linfocitos humanos.

- La coagulasa: es una proteína extracelular que se une a la protombina en el huésped para formar un complejo llamado estafilotrombina. Convierte el fibrinógeno en fibrina. Es un marcador tradicional para identificar SA en el laboratorio microbiológico. Si bien no está clara su participación como factor de virulencia, se especula que la bacteria podría protegerse de la fagocitosis y las defensas inmunes, al causar la coagulación de la sangre.
- La estafiloquinasa: es fibrinolítica, lisa la fibrina.

Como se comenta antes, muchos de los factores de virulencia no actúan al unísono, sino que su aparición está regulada genéticamente por complejos sistemas de regulación. Uno de ellos, el sistema *agr,* llamado de autoinducción, es el más conocido. Llamado también "el paradigma de la regulación genética de la virulencia de SA".

Por este mecanismo de autoinducción o "quorum sensing" (sensor de quorum) las bacterias determinan su propia densidad poblacional recurriendo a sensores o moléculas inductoras, a fin de regular la elaboración de sus productos. El *agr* funciona como un sensor que controla la densidad poblacional. Se gatilla ante la densidad poblacional elevada. Regula, entre otros componentes, la formación de cápsula.

Un ejemplo de cómo funciona el autoinductor:

Al inicio de una infección en tejido blando, por SA, la densidad poblacional es baja, la bacteria comienza a multiplicarse. Si las condiciones de oxígeno, pH, nutrientes, son adecuadas, la bacteria se multiplica y sólo sintetiza proteínas de superficie, del soma bacteriano.

Se expresan solamente adhesinas de superficie durante esta fase de crecimiento exponencial, con densidad poblacional baja, circunstancia donde el sistema *agr* está apagado.

Cuando la bacteria se encuentra en la fase postexponencial y estacionaria, donde la densidad poblacional es alta, el sistema se dispara. Esto ocurre cuando las condiciones del medio se vuelven adversas, por disminución de nutrientes, oxígeno, pH. Se produce al mismo tiempo acumu-

lación del autoinductor lo que dispara el sistema y la bacteria comienza a sintetizar las toxinas y sustancias que le servirán de evasión de las defensas del huésped y entre ellas la cápsula. Se evade del absceso y puede así iniciar focos de infección a distancia, por vía hematógena. La osteomielitis por vía hematógena da cuenta de ello.

Por ello, la formación de cápsula se regula según variables que tienen que ver con las condiciones de tensión de oxígeno, pH, de nutrientes, que influirán en la densidad poblacional, entre otros aspectos.

En una infección crónica, de larga evolución, como osteomielitis, FQ, donde pueden existir distintos microambientes, con diferente tensión de oxigeno, pH, llegada de nutrientes y otras condiciones, la adaptación de SA es diferente, se seleccionan distintos fenotipos y distintos genotipos.

También los antimicrobianos no tienen idéntica llegada y se pueden seleccionar bacterias con diferente perfil de sensibilidad. Esto explica el hecho de que en una infección aguda es probable que se recupere una población uniforme de SA, no así en una crónica.

Por ello existe la posibilidad de encontrar cepas capsuladas en infecciones agudas y no capsuladas en las infecciones osteoarticulares crónicas.

En varias muestras de PPB y huesos, de un mismo paciente, no siempre se recupera idéntico SA, incluso pueden recuperarse cepas de diferente perfil de sensibilidad.

> **Esto apoya la necesidad de que todas las muestras de PPB y de hueso, tomadas simultáneamente de un paciente, deben ser estudiadas para identificación de cepas y determinación de su perfil de sensibilidad.**

El reservorio: la cavidad nasal se identifica como el mejor reservorio de SA. No todas las personas portan SA en sus fosas nasales.

Se identifican tres grupos de personas:

- aquellos que nunca se colonizan con SA
- los que están siempre colonizados por SA
- los que se colonizan intermitentemente.

La cápsula: se describió en 1931 y actualmente se reconocen más de 11 serotipos en base a la capsula. Muchas cepas no pueden expresar la cápsula.

Los serotipos de mayor virulencia clínica en humanos son los tipos 5 y 8 (más del 85% de las cepas), los que fueron propuestos como componentes vacunales.

Se especula que la falta de resultados promisorios con los inmunógenos evaluados, es debido a que una protección adecuada no se lograría solamente estimulando la respuesta inmune humoral, sino que debería estar acompañada de una respuesta local mediada por células que estimulen los linfocitos T capaces de erradicar los estafilococos intracelulares al activar células fagocíticas.

Las propuestas incluyen otros componentes bacterianos que interaccionan en la relación huésped- patógeno, como así también en los mecanismos de evasión del sistema inmune y en las etapas más avanzadas de la infección, intentando lograr respuestas humorales y celulares balanceadas, propuestas en ensayo en vacunas contra la mastitis estafilocócica.

Se especula que el fenotipo NT (que no posee cápsula) posee una ventaja adaptativa que posibilita su persistencia en el huésped. En estudios en animales se demostró que la cepa no capsulada se internaliza en mayor proporción que la capsulada.

SA es un importante patógeno hospitalario y de interés por el notable incremento de cepas resistentes a los ß-lactámicos (su tratamiento de elección) por modificación del sitio blanco: las proteínas fijadoras de penicilina (PLP).

La resistencia a la meticilina fue una de las formas de detección, por lo que se los conoce como (SAMR) a los SA con dicha resistencia. Otras drogas como oxacilina y cefoxitina son de mayor utilidad para caracterizar estas cepas.

Así como otros microorganismos, SA tiene islas de patogenicidad, que contienen varios genes localizados en elementos móviles que codifican para determinantes de virulencia y para la resistencia a antimicrobianos.

Hacia la década del 60 emergen los SA con resistencia a la meticilina (SAMR) los que estuvieron siempre confinados al ambiente hospitalario y eran los agentes etiológicos recuperados habitualmente en las infecciones nosocomiales.

A mediado de la década del 90 surgieron infecciones por SAMR en pacientes de la comunidad (SAMR-CA), infecciones que se caracterizaron por una rápida diseminación.

> "La introducción de un elemento genético móvil llamado casete cromosómico del estafilococo (SCC*mec*) en una cepa sensible a la meticilina genera la resistencia a la meticilina y a todos los antibioticos betalactámicos . Esto ocurre porque este casete (SCC*mec*) contiene el gen *mec*A que codifica para una proteína ligadora de penicilina adicional la (PBP2a) con escasa afinidad por los antibióticos betalactámicos. Estos casetes están constituídos por dos elementos: el complejo *mec* formado por el gen *mec*A y sus elementos regulatorios y el complejo recombinasa de casete cromosómico *(ccr)* responsable de su movilización. Los distintos tipos de de SCCmec surgen de la combinación del complejo *mec* y el complejo *ccr.* Hasta la fecha se han descripto 9 tipos de SCC*mec* en aislamientos de humanos: SCC*mec* I al VIII y V_T…..Los casetes de tipo I, II y III incluyen genes de resistencia a antibioticos no betalactámicos….Los SA que portan estos SCC*mec* son multirresistentes, mientras que los casetes de tipo IV, V y VII más pequeños y presumiblemente mas móviles se asocian a aislamientos de la comunidad que por lo general no presentan multirresistencia". (Paula Gentile . Alejandra Corso. AAM 2011)

Las cepas SAMR adquiridas en el ambiente hospitalario (SAMR-HA) tienen resistencia múltiple acompañante a múltiples antimicrobianos como aminoglucósidos, quinolonas y otros. Estos SAMR-HA, ocurren más frecuentemente en pacientes añosos y con co-morbilidades, causando bacteriemias, infecciones de la herida quirúrgica y neumonías.

Las cepas SAMR- CA generalmente no presentan resistencia a múltiples antimicrobianos.

Las cepas SAMR- CA afectan generalmente a personas sanas y jóvenes, personal militar, prisioneros, deportistas, aborígenes etc sin factores de riesgo para SAMR-HA. Las infecciones producidas se asocian a infecciones de piel y partes blandas, aunque también pueden producir infecciones severas como la neumonía necrotizante, sepsis y otras. Es una patogenia multifocal con cepas de mayor virulencia.

A pesar de apariciones esporádicas como brotes o casos en distintos lugares del mundo como Australia, Canadá, Francia, E.E.U.U. y otros países, recién hacia el año 2001 hacen su aparición en Uruguay, constituyendo un brote que involucro a 1000 casos y produjo muchas muertes en Montevideo en el año 2003, cepas de SAMR-CA con diferente patrón de resistencia de las SAMR-HA.

En nuestro país los primeros aislamientos de SAMR-CA aparecieron ya en el año 2000 y 2001 y fue aumentando su presencia en diferentes pro-

vincias desde un 0.8% en 2000 a 20 % en 2009 y superando el 64 % ya en nuestra provincia, Misiones, en niños.

Es característica de las cepas de SAMR- CA, que entre los numerosos genes que porta, se encuentran los que codifican para algunas enterotoxinas, además de la LPV que es una toxina que destruye neutrófilos por formación de poros en su membrana y el ACME (arginine catabolic mobile element) que se asocia a la colonización de estas cepas en personas sanas y a su diseminación en la comunidad. La LPV es un buen marcador epidemiológico de las cepas de SAMR -CA, a pesar de no haberse podido, aún, demostrar su importancia en la diseminación, virulencia y persistencia de estas cepas.

Se sugiere que cepas de SAMR-CA provienen de las cepas de SAMS de la comunidad que han evolucionado y a las que les fue introducido el gen tipo IV. Se cree que el gen *mec* A fue transferido desde *Staphylococcus epidermidis* a SA in vivo, en niños durante tratamientos con alguna oxacilina por una bacteriemia por SAMS.

La primera definición de SAMR-CA dada por el CDC (Center for Disease Control and Prevention) en el año 2000, comprendía a los SAMR aislados de pacientes de la comunidad o de las primeras 48 hrs de internación, sin factores de riesgo como hemodiálisis, cirugía, internación previa el año previo, presencia de catéteres u otros dispositivos y sin aislamiento previo de SAMR, (las infecciones por SAMR que no cumplían con estos requisitos eran consideradas hospitalarias (SAMR-HA).

Fue recién a partir del año 2003 que se aceptó que los SAMR-CA pueden causar brotes nosocomiales y que SAMR-HA pueden circular en la comunidad.

En la actualidad el sólo caracterizar un SAMR-CA y diferenciarlo de un SAMR-HA por la ausencia de factores de riesgo, el fenotipo de sensibilidad a antimicrobianos no betalactámicos y el haber sido recuperado antes de las 48 hrs de internación, no son elementos suficientes. Se requiere de estudios moleculares específicos como tipo de SCCmec, presencia de la LPV entre otros.

Estudio realizado sobre cepas de la Republica Argentina realizado entre 2001 y 2011 por WHONET sobre 49909 cultivos de SA la proporción de SAMR alcanzo el 39.7 % en 2001, el 52.1 % en 2011, especialmente en niños.. Este incremento se asoció a SAMR.CA que de 6.4% en 2001 alcanzó un 38.9% en 2011, lo que sugiere que en Argentina cepas SAMR-CA están reemplazando a las cepas a las clásicas cepas SAMR que causan in-

fecciones del ambiente hospitalario incrementado el reservorio y la trasmisión de dichas cepas en dicho ambiente.

En nuestra provincia, Misiones, el primer estudio sobre SAMR-CA, lo realiza la Dra Martha von Specht entre el año 2003 a 2006, estudio que concluye en su tesis doctoral ": *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina de la comunidad. Primer alerta desde Misiones". Se estudiaron 282 niños entre 2 meses a 14 años de edad con infecciones por SAMR, de los cuales el 18%fueron casos calificados como SAMR-HA(nosocomiales), y el 65% provenientes de la comunidad SAMR- CA. La gentileza de la autora al aportar un resumen de su tesis para nuestro conocimiento y divulgación en este tema tan importante para la región, posibilita una mejor mirada y la necesidad de identificar correctamente a SAMR-CA a fin de colaborar con la epidemiología y manejo terapéuticos de estas cepas en nuestra zona geográfica:

> "En esta tesis, se presenta una descripción de observaciones clínicas, epidemiológicas y microbiológicas hasta el nivel molecular de *S. aureus* resistente a meticilina (SAMR), las que contribuyeron a las primeras comunicaciones publicadas en Argentina de la situación de un fenómeno emergente: SAMR adquirido en la comunidad (SAMR-CA).
> Se diseñó un estudio descriptivo transversal para el período 2003 - 2006, que incluyó todos los casos de infecciones por SAMR detectadas en el laboratorio.
> Previa definición de infección adquirida en la comunidad o en el hospital de cada caso en particular, se analizaron según correspondan los datos: edad, género, sala de internación, número de contactos domiciliarios que comparten habitación, convivientes con síntomas idénticos, tratamiento previo antibiótico inmediato y en los seis meses previos, concurrencia a guardería, antecedente de internación en los últimos 6 meses, enfermedad de base, conviviente trabajador de la salud, características clínicas, microbiológicas, y entre las infecciones de piel y partes blandas, las coinfecciones.
> Entre las infecciones adquiridas en el hospital, se analizaron los factores de riesgos intrínsecos (FRI, propios del paciente, como enfermedad preexistente), y extrínsecos (FRE, procedimientos invasivos).
> Para el almacenamiento y análisis univariado y bivariado de datos se utilizó el programa, Epi Info 6; la prueba de Chi^2 (error de estimación de 0.05 %) para determinar si existe asociación estadísticamente significativa entre las variables. Los análisis factoriales de correspondencias simples y múltiples se realizaron utilizando el paquete estadístico SPAD-N V 4.01 1987-1999 (CI-

SIA CERESTA) del programa PRESTA (Programme de Recherche et D' Enseignement en Statistique Apliquee) con el asesoramiento del Instituto Nacional de Epidemiología "Dr. Juan Jara".
Se confirmó la emergencia y diseminación en la comunidad y el hospital de cepas resistentes a meticilina compatibles con la definición microbiológica de SAMR-CA.
Se observó desde el año 2003, un incremento proporcional de 25 casos por año (r2= 0,98) en las infecciones atribuibles a SAMR, desde un 22,5% del total de S. aureus ese año, en los siguientes de 38%; 42,7% hasta alcanzar el 58% en el año 2006, lo que significó un 40% de resistencia global a meticilina. Entre estos SAMR, que fueron los seleccionados para el estudio (N=282), se detectó el patrón de resistencia (PR) a β-lactámicos, sin resistencia acompañante (RA) a otras drogas (PR1). Éste, surgió en el año 2003, y marcó una tendencia de aumento año a año haciéndose claramente prevalente en 2006.
Predominaron las infecciones adquiridas en la comunidad (64,9 %), las que surgieron en 2003. El 18,8% fueron adquiridas en el hospital, y relativamente estables en los cuatro años.
No se encontraron factores de riesgo fácilmente identificables para las infecciones adquiridas en la comunidad. El perfil clínico-epidemiológico de los pacientes mostró gran homogeneidad en la población, el 90% involucró infecciones de piel y partes blandas con evolución terapéutica favorable en clínica médica, y relativamente pocos casos de infecciones invasivas que requirieron internación primaria en cuidados críticos o intervención quirúrgica.
En las infecciones de piel y partes blandas adquiridas en la comunidad predominaron los abscesos cutáneos, celulitis e impétigo cuyos sitios topográficos principales fueron miembros inferiores, extendidos en forma generalizada y el tronco. Entre las infecciones invasivas, predominaron las infecciones osteoarticulares (principalmente hematógenas sin sitios múltiples de infección) y neumonías (con derrame pleural, empiema y evolución favorable sin necesidad de asistencia respiratoria mecánica). La Leucocidina de Panton Valentine (una citotoxina asociada a SAMR-CA) no fue un marcador para la mayor complejidad de los cuadros. Se diagnosticaron cuatro meningitis, las que fueron descriptas en la presente tesis. Una de ellas fatal. En estas, el compromiso de piel no fue marcador de un foco inicial, por lo que debe considerarse la etiología de SAMR-CA en las meningitis agudas de la comunidad en nuestro hospital, y ajustar las terapias empíricas.

Históricamente, S. aureus resistentes a meticilina y a otros agentes antimicrobianos se limitaba casi exclusivamente al ambiente hospitalario. Estos aislamientos solían ser multirresistentes.

La multirresistencia (con variados antibiotipos) se observó en el 11,24% de los aislamientos, todos ellos, al igual que la mayor parte de los PR con resistencia acompañante a por lo menos un antibiótico no □-lactámico, fueron provenientes de infecciones de adquisición nosocomial. El PR1, ocupó el segundo lugar entre estas, lo que demuestra la diseminación del mismo dentro del hospital. De acuerdo a los PR, las infecciones causadas por SAMR de origen incierto se corresponden mayoritariamente con los SAMR-CA.

El 50% de los pacientes con infecciones adquiridas en el hospital, tuvo al menos un FRI (predominaron las enfermedades neurológicas y la desnutrición). Un alto porcentaje (96%) había sido sometido a algún tipo de procedimiento invasivo (particularmente los catéteres venosos) y estuvo expuesto a antibioticoterapia previa.

Los sitios primarios de infección hospitalaria más frecuentes fueron la infección primaria de sangre asociada a catéteres venosos, las infecciones de sitio quirúrgico y las infecciones de piel y partes blandas, las que se relacionaron con las tipologías de los pacientes de acuerdo a los factores de riesgo.

El perfil clínico epidemiológico de los pacientes con infecciones hospitalarias mostró tres clases (tipologías) de pacientes de acuerdo a los FRI y tres de acuerdo a los FRE. Si bien las clases de acuerdo a los FRI respecto de las clases de acuerdo a los FRE no se relacionaron, fue más frecuente pertenecer a la clase 2 de FRI (pacientes eutróficos) y a la 1 de FRE (internación en cirugía, niños mayores), lo que puso en evidencia la capacidad invasiva de SAMR más allá de los riesgos de los pacientes, y que debe ponerse especial énfasis en el cumplimiento de normas preventivas.

Se detectó el gen mecA en el 100% de los aislamientos ensayados. El 96% presentó SCCmec tipo IV y el 4% SCCmec tipo I. No se detectaron SCC mec tipo II ni tipo III y los genes de la LPV se detectaron en el 77 % de los aislamientos (todos SCCmec tipo IV).

Se encontraron diez patrones de electroforesis de campo pulsante (PFGE) diferentes. Los dos pulsotipos principales (A y G) eran SCCmec de tipo IV y LPV (+), y se asociaron a diversos cuadros. El A causó 2 casos de meningitis incluyendo el fatal. El pulsotipo F (5 aislamientos), tuvo solo un aislamiento LPV (+), no fueron tipables por PCR múltiple; se caracterizaron como SCCmec tipo IV utilizando métodos mas complejos.

El perfil molecular mostró tres clases diferenciadas, pero el examen molecular, no permitió la diferenciación del origen de las cepas, como causantes de infecciones adquiridas en el hospital o en la comunidad.

El presente trabajo constituye un aporte a la epidemiología de la región, y contribuye a mejorar la situación de la salud en la provincia, brindando herramientas para la toma de decisiones en cuanto a prevención y el establecimiento de normas para el tratamiento empírico adecuado".

Clostridium perfringens

Previamente conocido como *Clostridium welchii, Clostridium perfringens* es uno de los patógenos bacterianos más ampliamente distribuidos en el medio ambiente, suelo, agua, y sedimentos marinos. Algunas especies forman parte de la microbiota endógena del colon de animales y humanos. Se lo encuentra en el suelo, y en las heces de casi todos los vertebrados, animales salvajes y domésticos.

Es un bacilo grampositivo anaeróbico involucrado en más del 80% de los casos de gangrena gaseosa.

La denominación de gangrena gaseosa proviene del griego *gangraina*, úlcera devoradora, o mionecrosis (*myo*, músculo y *necrosis*, muerte).

Otros clostridios pueden ser responsables de esta patología, con menor frecuencia como *Clostridium novyi* en 10-40% de los casos y *Clostridium septicum* en 5-20%. *Clostridium histolyticum, C. fallax, C. bifermentans, C. sordelli* son especies implicadas.

Las infecciones producidas por estos microorganismos son generalmente exógenas, como: botulismo y tétano, la intoxicación alimentaria, la gangrena gaseosa asociada frecuentemente a traumatismo y heridas contaminadas y la diarrea.

En general los clostridios se clasifican en:

1. clostridios neurotóxicos: *C. tetani* y *C. botulinum,* los agentes responsables del tétano y del botulismo respectivamente.
2. clostridios histotóxicos: *C. perfringens, C. novyi, C. septicum, C. bifermentans. C. histolyticum* asociados a infecciones secundarias a heridas o traumatismos vários de diversos tejidos y de diversa severidad.
3. clostridios enterotóxicos. *C. perfringens* y *C. difficile* causantes de intoxicaciones alimentarias y patologías gastrointestinales.
4. clostridios piógenos: *C. perfringens* - *C. ramosum* responsables de cuadros purulentos, muchos polimicrobianos.

Todos los clostridios son bacilos grampositivos relativamente largos, formadores de esporas, endoesporas, con un metabolismo estrictamente fermentativo.

C. perfringens no presenta motilidad y forma esporas in vitro sólo en medios de cultivo especiales. Crece en medios ricos en carbohidratos, con facilidad y en ellos produce, dada la fermentación, grandes cantidades de hidrógeno y dióxido de carbono, manteniendo un ambiente anaeróbico.

C. perfringens es relativamente aerotolerante, en especial cuando se siembra en placa de agar-sangre y puede sobrevivir aun con tensiones de oxígeno que inhiben otros anaerobios.

Es uno de los anaerobios estrictos de crecimiento más fácil.

Ha sido, además, la primera bacteria grampositiva de la cual fue posible obtener el mapa genómico completo el que fue logrado debido a su relativa tolerancia al oxígeno, rápido crecimiento y, sobre todo, por su capacidad para ser manipulado genéticamente .

Las cepas de *C. perfringens* pueden poseer una cápsula cuya composición en carbohidratos varía entre aislamientos; esto permite su serotipificación capsular.

Entre los productos de la fermentación se encuentran ácido butírico, ácido acético, butanol y acetona como productos finales y una gran cantidad de gas durante la fermentación de azúcares.

Producen también una amplia variedad de enzimas extracelulares, de interés en las infecciones a las cuales están asociadas, las que participan en la invasión y en el proceso patogénico.

La mayoría de los clostridios son saprófitos y pocos son patógenos para los humanos.

Clostridium perfringens se presenta como un bacilo grampositivo corto y regordete entre 2 a 4 µm y de longitud 1 a 1,5 µm de ancho.

A diferencia de los otros clostridios patógenos, es inmóvil y no produce esporas en los medios comunes. Solo lo hace cuando se usan medios especiales para esporulación.

Las esporas están presentes en el suelo, sedimentos y áreas sujetas a la polución fecal de humanos y animales. Son ovales y centrales y raramente se observan en las muestras clínicas.

En diversos medios de cultivo, produce patrones característicos de crecimiento:

- cuando se desarrollan con rapidez pueden tener formas cocoides o cúbicas o formas alargadas a medida que los cultivos envejecen.

- en medios de agar sangre presenta zona de doble hemólisis, formada por una estrecha zona de hemólisis completa, que se atribuye a la toxina θ (theta) rodeada de una zona mayor de hemólisis incompleta que se atribuye a la toxina α (alfa).
- en medios de agar sangre sembrado al lado de *Streptococcus agalactiae* produce una zona de β hemólisis sinérgica (prueba de CAMP inversa).
- en medios con suero o yema de huevo produce opalescencia. Esta reacción denominada "reacción de Nagler "se atribuye a la toxina α que es una lecitinasa. Esta prueba permite una identificación presuntiva de *Clostridium perfringens.*
- en medios con leche produce una fermentación tormentosa. La fermentación de la lactosa de la leche produce gran cantidad de ácido que coagula la caseína (la proteína de la leche) coágulo que a su vez es destruido por el abundante gas que se libera de la fermentación de la lactosa. También es una buena prueba para diagnóstico presuntivo de *Clostridium perfringens*.

Dado que tanto la reacción de Nagler, como la fermentación de la leche, son también producidas por otras especies de *Clostridium,* estas pruebas deben ser acompañadas de otras, para lograr un diagnóstico correcto.

El camino al Daño

Como ocurre con todas las infecciones anaeróbicas en los tejidos, este clostridio crece y se multiplica con rapidez en tejidos vulnerables a dicha invasión y en este caso la vulnerabilidad pasa por tener un potencial de oxidorreducción disminuido, pH bajo y tejidos desvitalizados.

Tales situaciones son favorables en contaminación con tierra, polvo en accidentes de tránsito, heridas de guerra, entre otras situaciones, transportando las bacterias desde el contenido intestinal propio o de piel.

Cuando las esporas germinan en condiciones anaeróbicas en los tejidos desvitalizados, las bacterias crecen, se multiplican y secretan sus poderosas toxinas para iniciar el daño.

La fermentación de hidratos de carbono y la acumulación de productos tóxicos por la degradación tisular, provocan gran cantidad de gas.

Esta bacteria no se multiplica en tejidos sanos.

Está asociada a severas infecciones de tejidos blandos, infecciones del tracto genital, intraabdominal, sepsis y a la intoxicación alimentaria por ingestión de alimentos con deficiencias en su preparación permitiendo que esporas contaminantes, germinen.

Cuando *Clostridium perfringens* penetra en los tejidos mediante algún mecanismo de rotura de la piel, como heridas, fracturas etcétera, puede desarrollar una mionecrosis o gangrena gaseosa o celulitis cuando solo infecta y daña el tejido conectivo subcutáneo.

La celulitis localizada representa la forma más común de las infecciones de las heridas donde están involucrados los clostridios.

La mionecrosis o gangrena gaseosa es de mayor severidad, comprometiendo la vida del paciente con marcados signos sistémicos de shock.

Varias son las enzimas que dañan el tejido conectivo facilitando la diseminación del clostridio. Ejemplo de ello: hialuronidasa, colagenasa, proteasa, lipasa.

Las toxinas que causan la gangrena gaseosa y también infecciones intestinales, son citotoxinas, lesionan directamente las células. Las principales tienen acción necrotizante, las que son hemolizantes y letales.

Actualmente, la toxinotipificación es el método más difundido de clasificación de *C.perfringens*. Este método tipifica a la bacteria en cinco tipos (A, B, C, D y E) según la producción de las toxinas alfa, beta, épsilon y la iota.

Es importante destacar que ya se conocen 15 toxinas proteicas. Dentro del resto de las toxinas no utilizadas en la clasificación, pero importantes desde el punto de vista patológico, se encuentra la enterotoxina de *C. perfringens* o CPE.

Los patógenos para el ser humano son los tipos A y C.

La toxina α (alfa) es común a los 5 tipos serológicos. Es una zincmetalofosfolipasaC (lecitinasa) que daña las membranas celulares e hidroliza la esfingomielina, de importancia en la gangrena gaseosa. Escinde la lecitina, principal fosfolípido de las membranas celulares, en fosforilcolina y diacilglicerol.

La toxina alfa es el principal factor de virulencia de la gangrena gaseosa en humanos y animales y de la enteritis necrótica de bovinos, equinos y pollos.

Todos los tipos de *C. perfringens* poseen los genes codificantes para esta toxina (*plc*); sin embargo, no todas las cepas la producen y existen grandes variaciones en las cantidades producidas.

La toxina alfa además tiene actividad enzimática, tanto de fosfolipasa (fosfolipasa-C o FLC) como de esfingomielinasa (SMasa) y, además, es hemolítica y dermonecrótica.

El gen *plc* tiene ubicación cromosómica y su expresión es estimulada por la disminución de la temperatura. Esto obliga a la bacteria a producir más FLC, para degradar membranas y otros lípidos del ambiente y generar así fuentes de carbono y energía cuando la bacteria se encuentra en condiciones adversas como un ambiente externo o en el suelo, no así cuando se encuentra a la temperatura corporal.

La toxina alfa puede ser además hemolítica en presencia de calcio, situación ésta que se da en los eritrocitos humanos y de algunos animales.

El efecto citotóxico de esta toxina está dado además por la hidrólisis de fosfolípidos de membrana lo que conduce a la acumulación de diacilglicerol que activa la vía del ácido araquidónico. Se especula que la toxina alfa imita la acción de la FLC intracelular en la membrana de células eucariotas.

El tipo A es el que la produce en mayor cantidad.

Al ser dermonecrótica y hemolítica lleva a la destrucción de eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Produce el debilitamiento de la membrana plasmática de las células de los músculos. Destruye el músculo (mionecrosis), por cuya acción el mismo pierde la capacidad de reaccionar a los estímulos.

El efecto más asociado a la letalidad, en estudios con animales, es el colapso cardiovascular.

Esta toxina es la más importante y principal responsable del daño en la gangrena gaseosa.

- la toxina β (beta) no es hemolítica pero sí necrotizante y letal. Los tipos B y C son los que la producen en mayor cantidad.
- la toxina θ (theta) es una hemolisina y la produce el tipo C y es tóxica para los leucocitos humanos y se propone como la responsable de la ausencia de polimorfonucleares en el tejido muscular infectado.
- la toxina κ (kappa) es una gelatinasa y coagulasa letal y necrotizante. Destruye el tejido conectivo resultando en la destrucción del músculo.

La bacteria produce además, una serie de sustancias como neuraminidasa, sialidasa, enterotoxinas y otras hemolisinas y toxinas diferentes a las anteriores descriptas.

La intensa producción de toxinas, por parte de la bacteria, las que se diseminarán desde la lesión inicial hacia los tejidos sanos adyacentes, pro-

duce el daño tan severo en estas infecciones. La infección es rápidamente progresiva y destructiva.

La necrosis muscular (el músculo dañado se vuelve negro y gangrenoso) y la toxicidad sistémica, son manifestaciones elocuentes del daño.

Como resultado, la zona se edematiza por la abundante acumulación de gas dentro del músculo (crepitaciones que se palpan como burbujas de gas debajo de la piel), lo que origina alteración en el aporte sanguíneo que conduce a disminuir aún más el potencial de oxidorreducción y el pH, lo que aumenta el daño.

El paciente presenta fiebre, hipotensión y disminuye su función renal de excreción. La muerte por shock y falla renal ocurre en pocos días.

La muerte y la severidad del daño aún no están bien definidas.

La clínica y el tratamiento ■ mabel rinaldi

Las infecciones de piel y partes blandas son frecuentes y en su mayoría fáciles de ser tratadas porque generalmente sus manifestaciones son de carácter leve o de moderada severidad.

En este tipo de infecciones, es necesario realizar una buena historia clínica que incluya datos como ser: estado inmune, datos epidemiológicos, antecedentes de traumatismo y/o cirugía, práctica de deportes, inicio y evolución de la lesión, uso previo de antibióticos.

Luego se debe examinar la lesión y si está o no acompañada de síntomas y signos sistémicos de infección.

Se procederá en función de los hallazgos clínicos la decisión de realizar toma de muestra ya sea por biopsia o punción aspiración con aguja fina para el estudio microbiológico.

Finalmente se evaluará la necesidad de abordaje quirúrgico y la incorporación del tratamiento médico.

En las infecciones como: impétigo, erisipela y celulitis, encontrar el agente etiológico es dificultoso y en la mayorías de las veces hasta innecesario.

El médico clínico o infectólogo deberá escoger el tratamiento antibiótico más adecuado a la necesidad del paciente en función de la evolución local y sistémica, severidad de la infección, el agente etiológico y patrón de resistencia- susceptibilidad antibiótica local.

La evaluación clínica de la infección y de su severidad es muy importante.

Recientemente las guías confeccionadas por la Sociedad Americana de Infectología en el año 2014, clasifican a estas infecciones en:

- Infecciones de piel y partes blandas no purulenta en la que están incluidas: Infecciones necrotizantes, celulitis y erisipela
  * Infecciones no purulenta leve presenta el hallazgo típico de erisipela o celulitis sin áreas de purulencia.
  * Infección no purulenta moderada son aquellas que presentan los signos y síntomas de erisipela o celulitis con signos sistémico de infección.
  * Infección no purulenta severa es aquella que no ha respondido a tratamiento instituido por vía oral o bien la infección que desde su inicio presenta signos y síntomas de afectación de tejido profundo: presencia de áreas desvitalizadas, bullas, ampollas y marcado dolor y que además presentan evidencias de disfunción orgánica o bien presencia de infección de piel y partes blandas en pacientes inmunosuprimidos.
- Infecciones purulentas: forúnculos, abscesos y carbunclos
  * Todas las infecciones de piel y partes blandas a su vez se clasifican según su severidad en infecciones leves, moderadas y severas.
  * Las infecciones purulentas moderadas son las que se presentan con signos y síntomas de infección: dolor, edema, aumento de temperatura local y fiebre.
  * Las infecciones severas son aquellas que no han respondido al drenaje quirúrgico y al tratamiento antibiótico administrado por vía oral o bien aquella que en forma inicial presentan signos y síntomas de repercusión sistémica.

Repercusión sistémica: presencia de fiebre 38°C, hipotermia, taquicardia (mayor a 90 latidos por minuto), taquipnea FR 24/ minuto, leucocitosis 12.000 o leucopenia 4.000 o infección en paciente inmunosuprimido.

Ante la presencia de estos signos recomiendan la extracción de sangre para hemocultivos y determinación de hemograma, creatinina, CPK, estado acido base (EAB) y proteína C reactiva (PCR) cuantitativa.

- Infecciones en pacientes inmunocompetentes.
- Infecciones en pacientes inmunocomprometidos.

Infecciones de piel y partes blandas con repercusión sistémica

Pacientes con hipotensión y aumento de creatinina, bajo valor de bicarbonato, CPK elevada (doble o triple del valor normal), marcada desviación a la izquierda y PCR de 13 mg /dl deben ser hospitalizados y se debe realizar toma de muestra para cultivo de la lesión por punción aspiración con aguja fina o bien por biopsia profunda, muestras que deben ser enviadas al laboratorio de microbiología en condiciones adecuadas y en forma oportuna, con el objetivo de realizar tinción de Gram, identificación del agente etiológico y antibiograma.

Se debe solicitar además la rápida evaluación del médico cirujano con experiencia para la exploración, drenaje de colecciones y exéresis de todo tejido desvitalizado.

Se considera que las siguientes características orientan sobre la magnitud de la severidad de estas infecciones:

- Dolor desproporcionado a los hallazgos físicos.
- Presencias de flictenas.
- Hemorragia cutánea.
- Anestesia de la piel.
- Evolución rápida de las lesiones.
- Presencia de gas en piel.

Lamentablemente todos estos signos y síntomas aparecen tardíamente y son privativos de lesiones necrotizantes.

En estas circunstancias el abordaje quirúrgico oportuno y apropiado es de vital importancia en el tratamiento adecuado de estas infecciones, en conjunto con la elección adecuada de los antibióticos y el soporte clínico general.

Impétigo

Lesión caracterizada por un conjunto de vesículas distribuidas en racimos en la capa córnea de la piel, que posteriormente evolucionan a pústulas, luego estas se rompen para dar lugar a una costra gruesa amarillenta.

No hay signos sistémicos, sí puede acompañarse de adenomegalia regional.

Esta infección es frecuente en niños entre los 2 a 5 años especialmente en los que viven en climas húmedos y cálidos.

Los pacientes frecuentemente están colonizados por los gérmenes etiológicos y por lo cual se los vincula a factores de malas condiciones higiénicas y hacinamiento.

Se estima que la colonización precede al desarrollo del impétigo aproximadamente entre 7 a 10 días.

Las lesiones aparecen luego de pequeños traumatismos o abrasiones de la piel o bien luego de la picadura de insectos.

Se localizan en los miembros superiores e inferiores, cara, cuello, cuero cabelludo y zonas peri orificiales, las que rápidamente se diseminan por auto inoculación.

Las lesiones dejan un área hipo-pigmentada luego de la resolución de las mismas.

Complicaciones locales como celulitis pueden aparecer si las lesiones no son adecuadamente tratadas.

En presencia de cepas nefritogenicas de *Streptococcus pyogenes* puede dar a lugar a una complicación no supurativa como la glomérulo nefritis aguda (GNA).

La tinción de Gram y cultivo del pus o exudado de las lesiones de impétigo son recomendadas para identificar *Staphylococcus aureus y o Streptococcus pyogenes,* también el tratamiento en casos típico sin estos estudios se considera una conducta razonable.

> Tratamiento

La decisión de tratamiento antibiótico se basará en el número de las lesiones, la localización de las mismas y la necesidad de limitar la diseminación a otras personas.

La detección de anticuerpos antiestreptocócicos no es de valor para el diagnóstico, ni para el tratamiento del impétigo.

Inicialmente se recurre a la medicación antibiótica tópica. La mupirocina crema aplicada 2 veces al día por 5 días es considerada el tratamiento de elección. También se puede utilizar bacitracina y neomicina, aunque estos antibióticos son menos efectivos que la mupirocina.

Los pacientes con gran cantidad de lesiones y que no responden a la medicación tópica deben recibir antibióticos por vía oral.

El tratamiento se debe iniciar con una droga con actividad antiestafilococica si en cultivo bacteriano hay crecimiento de *Streptococcus pyogenes* la penicilina por vía oral sigue siendo el tratamiento de elección.

Las cefalosporinas de 1ra generación se pueden utilizar en función del resultado bacteriológico.

En pacientes alérgicos a ß-lactámicos y en pacientes con infección por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad (SAMR-CA) se podrá recurrir a la clindamicina o trimetoprima sulfametoxazol.

Abscesos

Lesiones purulentas que comprometen la dermis y tejidos blandos profundos. Estas lesiones se disponen en áreas ricas en glándulas sudoríparas y con abundancia de folículos pilosos.

Son dolorosas, eritematosas e induradas en su inicio y luego evolucionan con áreas fluctuantes y con la aparición de un orificio por donde drena abundante pus espeso de color amarillo verdoso.

La etiología puede ser monomicrobiana o polimicrobiana según la colonización de piel o mucosas donde asienta la lesión.

El tratamiento efectivo requiere el drenaje quirúrgico del pus y el desbridamiento de las loculaciones, seguidas de curaciones con antisépticos y cobertura de gasas secas.

Si bien la toma de muestra para bacteriología era hasta hace poco no necesaria, actualmente se hace imprescindible sobre todo cuando existen antecedentes de recidivas frecuentes, uso de antibióticos previos, internaciones, estado inmunológico comprometido, y en aquellos que presenten lesiones múltiples, esbozos de necrosis de piel, celulitis circundante y en presencia de signos y síntomas de infección con repercusión sistémica.

El agente etiológico responsable más frecuente es *Staphylococcus aureus.*

La incisión y el drenaje de la lesión es considerado piedra angular del tratamiento la decisión de administrar tratamiento antibiótico se realizara cuando el paciente presente la respuesta inflamatoria sistémica.

Tratamiento antimicrobiano: se deberá administrar antibiótico con actividad antiestafilococica en paciente con carbunclo y absceso y en pacientes inmunocomprometidos o que se encuentren en los extremos de la vida o en aquellos que presenten múltiples lesiones, en los que presenten recurrencias o en aquellos que no respondieron al drenaje quirúrgico.

En caso de estar frente a SAMR-CA se puede recurrir a clindamicina, doxiciclina o bien trimetoprima sulfametoxazol.

Forúnculos-carbunclos

Infecciones de los folículos pilosos usualmente causadas por *Staphylococcus aureus* en la cual el proceso inflamatorio y supurativo se extiende desde la dermis hasta el tejido celular subcutáneo donde forma una colección supurada.

Los forúnculos difieren de la foliculitis en la cual el proceso supurativo está en la dermis.

Las lesiones de forúnculos pueden ser únicas o bien extenderse a folículos y glándulas sudoríparas adyacentes, dando lugar a un proceso supurativo que drena pus por distintos orificios o fístulas conformando así una lesión extensa y confluente denominada carbunclo.

El carbunclo se localiza preferentemente en espalda, zona lumbar y cervical. Estas lesiones son casi privativas de pacientes con enfermedades subyacentes como diabetes mellitus descompensada o en pacientes con trastornos inmunológicos varios.

Tratamiento de los forúnculos abscedados: el carbunclo requiere de drenaje quirúrgico, el drenaje de forúnculos sin celulitis perilesional no requiere de tratamiento antibiótico concomitante.

La aparición de forúnculos por SAMR y SAMS puede ocurrir en familia o bien en comunidades cerradas, especialmente en grupos donde las lesiones de piel son frecuentes: deportistas y personas involucradas con prácticas recreacionales.

Factores de mala higiene personal o bien contacto estrecho con personas infectadas son de importancia para la diseminación de estas infecciones entre personas.

Tratamiento: baños con jabón antiséptico como iodopervinox o clorhexidina y uso personal de toallas, máquinas de afeitar, depiladoras y el correcto lavado de ropa personal y de cama, en conjunto con la descolonización nasal, son necesarios para interrumpir las infecciones cruzadas.

La modalidad terapéutica más efectiva para controlar la recidiva de la forunculosis es el uso de antimicrobianos para erradicar la portación nasal.

Para personas colonizadas, la aplicación de mupirocina nasal dos veces al día por 5 días es efectiva para reducir las recurrencias en un 50 % de los casos. Pocos antibióticos alcanzan niveles adecuados en la secreción nasal para lograr la eliminación de *Staphylococcus aureus*.

Clindamicina parece ser una opción y probablemente la mejor para tratar la forunculosis recurrente ocasionada por cepas de *Staphylococcus aureus* susceptible a este antibiótico.

Una toma diaria de 150 mg por 3 meses reduce la frecuencia de las infecciones en un 80%

Erisipela

La infección comienza con una pequeña pápula eritematosa que crece circunferencialmente con bordes rojos bien delimitados.

La piel caliente, eritematosa, brillante, con borde sobre elevado por el edema que demarca el límite entre el borde de expansión y la piel sana, es bien demarcado.

El centro de la lesión es más pálido y en casos severos pueden aparecer vesículas o ampollas que pueden evolucionar hacia la necrosis de la piel.

Las localizaciones actuales más frecuentes son la de los miembros inferiores, sobre todo en personas obesas, las que presentan enfermedad varicosa, linfedema o antecedentes de safenectomía.

En frecuencia le siguen las localizaciones en miembros superiores y generalmente en presencia de antecedentes de mastectomia y vaciamiento ganglionar axilar. La localización menos frecuente actualmente es la de la cara.

El diagnóstico es clínico y no está justificada la toma de muestra para cultivos en paciente inmunocompetente.

La toma de hemocultivo, biopsia o toma de muestras realizada por punción aspiración se recomienda en paciente inmunosuprimidos, pacientes con cáncer, quienes estén recibiendo tratamiento quimioterapico, en

quienes presenten antecedentes de traumatismo penetrantes, herida y contacto con agua y picadura de insectos

El pronóstico es bueno si se realiza diagnóstico rápido y la terapia antibiótica se instaura en forma oportuna.

La penicilina por vía oral o parenteral según la gravedad de la infección, es la droga de elección.

En pacientes con signos y síntomas de afectación sistémica, o ante rápida evolución con delimitación de áreas de necrosis o colección purulenta, antecedentes de colonización nasal por SAMR-CA, infecciones recurrentes cutáneas, o antecedentes previo de antibiótico se recomienda utilizar antibiótico con cobertura para *Staphylococcus aureus* como clindamicina, tms y en pacientes severamente enfermo vancomicina.

Foto 1. Paciente con erisipela severa observe eritema edema con limites bien demarcados de piel enferma de la sana, presenta además necrosis superficial de la epidermis.

Foto 2. Lesión macerada, eritematosa escamosa, pruriginosa en plieque interdigital correspondiente a dermatomicosis (puerta de entrada para erisipela y celulitis).

Celulitis

La infección del tejido celular subcutáneo se extiende más profundamente que la erisipela e involucra el tejido celular subcutáneo y no presenta los rasgos típicos de la erisipela. Los bordes son difusos y sin límites precisos, la piel esta edematizada (superficie comparable a la de una naranja); sobre esta superficie se pueden observar áreas de equimosis, presencia de vesícula, ampollas y verdaderas flictenas.

La celulitis puede acompañarse de signos de compromiso sistémico y éstos variarán según la magnitud de extensión en superficie y profundidad.

Es frecuente encontrar puerta de entrada cutánea como ser: traumatismo, excoriaciones, abrasiones, quemaduras y heridas cortantes.

Las manifestaciones sistémicas generalmente son leves, pero la presencia de fiebre, escalofríos, dolor intenso, taquicardia, confusión y marcada leucocitosis pueden preceder al proceso infeccioso.

La presencia de vesículas, equimosis y necrosis, fuertemente sugieren el compromiso de tejido profundo como la fascia y debe ser considerado y rápidamente diagnosticado.

La celulitis severa se caracteriza por la aparición de eritema, dolor y edema acompañada de fiebre, escalofríos, malestar general y evolución rápida hacia la formación de absceso local.

El 10 a 15 % de las lesiones son secundarias a bacteriemias.

En esta entidad es necesaria la realización de toma de muestra por punción aspiración, principalmente en pacientes inmunocomprometidos, aquellos que presentaron traumatismo en contacto con agua, tierra, materia fecal o materias orgánicas, mordeduras de animal o antecedentes de lesiones de piel recidivantes y en quienes no responden a tratamiento antibiótico para SAMS.

La punción aspiración tiene una rentabilidad de 15 a 40% para diagnóstico etiológico y los hemocultivos 5 a 8 %.

La elección del tratamiento antimicrobiano y sus vías de administración se decidirá teniendo presente las características epidemiológicas, severidad y extensión de la infección y la condición inmunológica del paciente.

Este tipo de infección es más frecuente en pacientes obesos, diabéticos, con enfermedad venolinfática, antecedentes de safenectomia, cirugías onco-ginecológicas.

Condiciones locales como infección por hongos dermatofiticos, maceración y ulceraciones de la piel son alteraciones que sirven de puerta de entrada para el desarrollo de celulitis.

Una diversidad de bacterias pueden ocasionar celulitis, pero algunas de ellas se vinculan a circunstancias especiales.

Ejemplo son las mordeduras de animales que se correlacionan con celulitis ocasionada por *Pasteurella multocida* en el 50 % de los pacientes mordidos por perro y gato.

Staphylococcus aureus y *Streptococcus pyogenes* son responsables de celulitis del 40 % de los pacientes mordidos por perros y gatos. Las otras bacterias encontradas son anaerobios de diversas especies.

El tratamiento antibiótico empírico de las mordeduras de animales con amoxicilina/ clavulanico ha demostrado buena eficacia.

Otras alternativas incluyen a doxiciclina, levofloxacina, ciprofloxacina, trimetoprima sulfametoxazol y cefuroxima. Estos últimos antibióticos requieren la adición de agentes con actividad antianaeróbica como metronidazol o clindamicina.

En pacientes que presentan infecciones con complicaciones infecciosas severas posterior a las mordeduras, se puede utilizar piperacilina tazo-

bactama, ertapenem, imipenem o bien meropenem como monoterapia, cefalosporinas de 3ra generación pueden ser utilizadas en combinación con un agente antianaeróbico.

Es importante recordar que todas las mordeduras deben recibir una buena toilette que permita la remoción de todo material orgánico y desbridamiento de tejidos mortificados. Se debe realizar una aproximación de los bordes de tejidos y no cierre por sutura.

Las heridas en cara son una excepción y pueden ser suturadas por cirujano plástico, previo a un meticuloso lavado con copiosa irrigación de solución salina y administración de profilaxis antibiótica.

La terapia antimicrobiana debe incluir en su espectro *Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus,* o bien amoxicilina clavulánico para celulitis que se adquieren en la comunidad y que no estén involucradas con exposición a mordedura de animales o accidente en medios acuáticos. En estas situaciones una buena opción es el uso de quinolonas.

Repetidos episodios de erisipela y celulitis causan linfedema y no poca veces el desarrollo de elefantiasis por lo cual es importante prevenir estas recurrencias con la administración de antimicrobianos: penicilina G benzatinica 1.200.00 UI cada 14 días o bien 250 mg de eritromicina cada 12 horas por vía oral. Penicilina vía oral 250 mg cada 12 horas demostró disminuir la recurrencia de los episodios.

También en importante tratar las lesiones micóticas, maceraciones y sequedad de la piel.

Se recomienda la elevación de los miembros inferiores, uso de media o vendas compresivas, evitar larga permanencia de pie, uso adecuado de calzados y en determinadas situaciones el uso de diuréticos a fin de disminuir el edema de los miembros inferiores.

Las cefalosporinas de 1ra generación o bien penicilina semisintética resistente a penicilinasa son las drogas de elección, para un tratamiento inicial. En pacientes alérgicos a la penicilina se podrán utilizar clindamicina, tetraciclina y en pacientes gravemente comprometidos vancomicina.

La falta de respuesta al tratamiento antimicrobiano empírico inicial deberá hacer sospechar la etiología de gérmenes no habituales o bien resistentes al tratamiento instituido o bien presencia de abscesos o de infección de tejidos profundo tales como fascitis necrotizante y mionecrosis.

En pacientes que presentan signos de sepsis o que refieran intenso dolor, se debe proceder al pedido de rápida exploración quirúrgica y toilette quirúrgica cuya extensión la decidirá el cirujano en función del compromiso del tejido subcutáneo, fascial y muscular subyacentes.

Foto 3. Paciente con celulitis y linfangitis.

Foto 4. Paciente con celulitis y área fluctuante en cara anterior de 1/3 inferior de pierna. Muestra diagnostica tomada por punción aspiración: secreción hemato purulenta.

Infecciones necrotizantes

Las infecciones necrotizantes difieren de las infecciones superficiales en su presentación clínica y compromiso del estado general del paciente y de las modalidades terapéuticas que se requieren para su adecuado tratamiento.

La infección que compromete el tejido celular subcutáneo hasta las fascias y o grupos musculares, se caracteriza por la rápida y gran destrucción de tejidos que pone en riesgo la vitalidad de un miembro y /o la vida.

Estas infecciones generalmente son secundarias a disrrupción de la piel ocasionada por traumatismo profundo o cirugías.

Se clasifican según la participación de los agentes etiológicos en monomicrobiana y polimicrobiana

Fascitis monomicrobiana causada por *Streptococcus pyogenes, Aeromonas hydrophila* y recientemente se describe a SAMR.

Fascitis polimicrobiana a la provocada generalmente por la asociación de anaerobios con cocos grampositivos aerobios y enterobacterias.

Las injurias traumáticas con aplastamiento muscular, fracturas expuestas, úlcera de decúbito, cirugía abdominal en pacientes con enfermedades subyacentes como ser diabetes, obesidad, enfermedad oncológica y enfermedad vascular periférica, son predisponentes para el desarrollo de este tipo de infección.

Esta infección es de evolución aguda y de localización preferencial en miembros inferiores, pared abdominal, glúteos, zona peri anal (gangrena de Fournier) y heridas quirúrgicas.

Esta infección presenta todos los signos inflamatorios de una celulitis acompañada de linfaadenitis y linfangitis.

Los cambios inflamatorios de la piel son secuenciales con aparición de flictenas entre 3 y 5 días de enfermedad y posteriormente se observa el desarrollo de gangrena cutánea evidenciada por decoloración cutánea que se delimita y cursa con anestesia por trombosis de los vasos pequeños.

Se observa gas y uno de los signos característicos como es la induración del tejido ”sensación de tocar madera”. Todos estos signos y síntomas están acompañados de marcada toxicidad del paciente.

En la fase inicial de la enfermedad es muy difícil realizar diagnóstico diferencial de la celulitis, pero la evolución de varios signos y síntomas son útiles para diferenciarlas:

- Dolor severo.
- Presencias de bullas, flictenas, áreas necróticas que demuestran compromiso de las arteriolas profundas.
- Gas detectado por la palpación o por radiografías.
- Edema que se extiende más allá del área de necrosis o eritema.
- La presencia de fiebre, escalofríos, taquicardia, sudoración profusa e hipotensión, delirio o confusión y evidencia en el laboratorio de leucocitosis, ascenso de creatinina y CPK y la rápida progresión de la in-

fección, son orientadores de estar en presencia de infección necrotizante.

Foto 5. Paciente con celulitis necrotizante. Observe eritema perilesional, bordes necrozados y necrosis de tejido celular subcutáneo.

> Fascitis necrotizante

Infección del tejido celular subcutáneo comprendido entre la fascia superficial y planos musculares subyacentes.

La puerta de entrada es detectada en el 80 % de los casos. En ocasiones la infección de la glándula de Bartholino o absceso perianal se extiende hasta comprometer los planos faciales del peritoneo o de la pared abdominal de los muslos o bien toda la pelvis.

En un 20% no se detectan lesiones previas al inicio de la infección.

La presentación inicial es la de una celulitis que progresa rápidamente o bien tiene una evolución subaguda, pero en la que se detectan signos y síntomas de compromiso sistémico.

Las manifestaciones locales son: aumento de la temperatura, dolor, descolocación de la piel, inicio de áreas necróticas o bien áreas anestésicas, o bien que los tejidos se presentan al tacto, acartonados o francamente indurados (consistencia de madera).

La fascitis necrotizante está íntimamente relacionada con grupos clínicos como ser:

- Antecedentes de cirugía abdominal o bien traumas abdominales con perforación intestinal.
- Úlceras de decúbito o peri anales.
- Inyecciones intramusculares en adictos endovenosos.
- Diseminación de infección de la glándula de Bartholino o infecciones vaginales.

En su fase inicial es difícil diferenciarla de la celulitis.

Toda celulitis que no tenga una buena respuesta al tratamiento y en presencia de los factores arriba mencionados, apoyan el diagnóstico de fascitis necrotizante por lo cual, se debe solicitar evaluación y exploración por médico cirujano.

El diagnóstico más importante para la fascitis es la exploración de la fascia, si ésta se encuentra edematizada y con cambio en su coloración, o bien la presencia de necrosis.

La secreción rojiza amarronada emerge luego de la disección quirúrgica. Aún después de llegar a profundidad no se visualiza la presencia de pus pero si se encuentra desvitalización del tejido subyacente.

La muestra de la secreción debe ser tomada para análisis bacteriológico. La tinción de Gram es de gran utilidad para guiar el tratamiento antimicrobiano.

El diagnóstico etiológico se obtiene por cultivo de las muestras tomadas en el acto quirúrgico.

El tratamiento quirúrgico es la modalidad terapéutica más importante de las infecciones necrotizantes.

La decisión del abordaje quirúrgico agresivo se establece en función de los siguientes elementos:

- no respuesta a tratamiento después de tiempo razonable de prescripción del tratamiento médico.
- presencia de sepsis.
- extensión del proceso infeccioso y/o la aparición de necrosis cutánea o de gas.

El tratamiento antimicrobiano debe incluir en su espectro la cobertura de bacterias gramnegativas aeróbicas, cocos grampositivos aerobios y otras bacterias, incluso anaerobias.

La clindamicina es útil para la cobertura de anaerobios y cocos grampositivos incluyendo a SAMS y SAMR susceptibles a este antibiótico.

Metronidazol tiene un espectro antianaeróbico mayor para anaerobios entéricos gramnegativos, pero es de menor utilidad para la cobertura de cocos grampositivos anaeróbicos

Las quinolonas fluoradas, piperacilina más tazobactam y ertapenem son útiles para la cobertura de bacilos gramnegativos.

Para la cobertura de infecciones adquiridas en la comunidad ampicilina/ sulbactam o bien la asociación de ampicilina/sulbactam más ciprofloxacina, es considerado el tratamiento de elección.

Para el tratamiento se fascitis necrotizante por *Streptococcus pyogenes* y/o síndrome de shock tóxico está indicada la asociación clindamicina más penicilina G sódica.

La racionalidad para el uso de clindamicina está basada en estudios clínicos y estudios in vitro donde se demostró la supresión de las toxinas y modulación de las citoquinas: interleukina (IL) y factor de necrosis tumoral (FNT)

En estudios de animales se demostró la mayor eficacia de clindamicina sobre los antibióticos ß-lactámicos.

Penicilina G sódica debe ser adicionada por el incremento de resistencia a los macrolidos por parte de *Streptococcus pyogenes*.

> Gangrena gaseosa

La puerta de entrada son lesiones musculares con aplastamiento, con marcado compromiso de la irrigación arterial y o la presencia de factores predisponentes subyacentes.

También se describen casos provocados por *Clostridium perfringes* en pacientes con antecedentes de aplicación de medicación colocada por vía intramuscular, sobre todo si se trata de pacientes de raza negra y drogadictos endovenosos.

La fascitis necrotizante y gangrena gaseosa causan necrosis de la piel, tejido subcutáneo y músculos.

Los cambios que se observan en el tejido comprometido son: edema, eritema, presencia de ampollas de contenido sanguinolento oscuro, área de anestesia de la piel, e induración del tejido celular subcutáneo en el marco de paciente con signos evidente de toxicidad sistémica.

En esta situación, la exploración y exéresis amplias de los tejidos comprometidos, hasta alcanzar márgenes vitales y sangrantes, es de vital importancia.

El tratamiento antibiótico para infecciones ocasionadas por *Streptococcus pyogenes* e infecciones necrotizantes de origen clostridial debe ser rápidamente instituido con clindamicina y penicilina, que es el esquema de elección recomendado.

Una variedad de antimicrobianos con actividad antianaeróbica, con espectro de cobertura para cocos grampositivos aeróbicos y bacterias gramnegativas como ser amplicilina sulbactam, piperacilina tazobactam, asociación de ciprofloxacina más metronidazol o clindamicina, también son también útiles en este tipo de infección. La administración de inmunoglobulina intravenosa en el tratamiento del síndrome de shock tóxico aún no establecido con certeza por la ausencia de trabajos que demuestren su eficacia.

El diagnóstico por imágenes TC y RMN detecta edema de los tejidos. En la práctica el juicio clínico es el elemento más importante para un diagnóstico. El rasgo más importante para el diagnóstico es la visualización del estado de los tejidos, fascia y grupos musculares en los planos quirúrgicos. La presencia del edema, tejidos necróticos, exudado color marrón bronce y áreas con poco sangrado son los hallazgo que definen el diagnóstico y la extensión de la infección.

> Piomiositis

Infección causada principalmente por *Staphylococcus aureus* que se caracteriza por la presencia de pus de un grupo muscular especifico. Ocasionalmente *Streptococcus pneumoniae* o bacilos gramnegativos son capaces de ocasionar piomiositis.

La presencia de bacteriemia puede ser detectada entre 5-30% de los casos. Por ser común en los países tropicales esta condición también es conocida con el término de piomiositis tropical.

Actualmente también se la diagnostica en países de clima templado y particularmente en infectados por el virus VIH.

Los hallazgos de esta entidad al examen clínico: dolor localizado en un grupo muscular (los más frecuentemente afectados son los cuadriceps, glúteos, dorsal ancho y los músculos de la pantorrilla) aumento de tempe-

ratura, leve eritema, induración marcada de los músculos afectados, acompañado de fiebre y escalofríos.

Imagen 1. Paciente con piomiositis. Observe la presencia de área hipó intensa en cara lateral de muslo derecho correspondiente a colección purulenta.

La localización de la colección es profunda. Por ello en sus estadios iniciales es poco frecuente detectar signos inflamatorios superficiales.

Lo que nunca está ausente es el dolor muscular, sobre todo en la movilización activa.

El diagnóstico en etapa temprana no siempre es fácil y se debe tener alta sospecha en pacientes que refieren dolor de un solo grupo muscular, con antecedentes de lesiones de piel o de traumatismo muscular que anteceden al dolor en 2 a 3 semanas.

El diagnóstico por imagen se requiere para establecer la localización y extensión del proceso inflamatorio purulento, la RMN es muy efectiva además de detectar el absceso muscular también es útil en demostrar focos infecciosos subyacente como osteomielitis, artritis séptica y trombosis venosa.

También es útil la ecografía y TC de partes blandas donde se puede observar el edema y la separación de los planos musculares. Además tienen utilidad en el diagnóstico diferencial con trombosis venosa.

La punción aspiración dirigida por ecografía o TC es útil para el diagnóstico y toma de muestra para bacteriología.

FOTO 6. Paciente con absceso muscular en deltoides izquierdo. Muestra diagnostica tomada por punción aspiración: secreción purulenta espesa.

El drenaje de la colección por vía quirúrgica o por punción percutanea y posterior colocación de drenaje, son necesarios para el tratamiento adecuado de esta infección en conjunto con el tratamiento antibiótico.

La drogas de elección para SAMS son las cefalosporinas de 1ra generación más rifampicina. En cepas SAMR, clindamicina más rifampicina o bien vancomicina o teicoplanina en sinergia con rifampicina o un macrólido, son buenas opciones.

> Celulitis necrotizante sinérgica

Infección necrotizante que involucra grupos musculares en adición de fascia y tejidos blandos superficiales.

El nivel de compromiso depende de la profundidad y de los planos afectados por el proceso patológico previo, que precede a la infección.

Los factores predisponentes más importantes son los abscesos perirrectales e isquiorrectales.

El reconocimiento y el tratamiento es similar a la fascitis necrotizante, pero la cirugía es el único elemento válido en determinar la extensión y profundad de la infección.

> Gangrena de Fournier

La gangrena de Fournier es una variante de infección necrotizante localizada en zonas de genitales (escroto, vulva y pene) que puede tener dos modalidades de presentación, la de inicio abrupto y la de evolución insidiosa.

La edad media de los pacientes es de 50 años y en un tercio de los casos hay enfermedades subyacentes como: diabetes, alcoholismo, infección urinaria asociada a prostatismo o estreches uretral, existencia de lesiones en perine que se extiende posteriormente al plano facial.

En un lapso de 24 a 48 horas se evidencia necrosis, que se limita a la piel y tejido celular subcutáneo y se extiende a la base del escroto para luego comprometer la piel del pene.

Los testículos y el cordón espermático están protegidos por tener flujo sanguíneo independiente y están indemnes de este proceso inflamatorio-infeccioso.

En caso severo la infección se extiende a la ingle y/o pared abdominal.

Los agentes etiológicos más frecuentemente involucrados son *Staphylococcus aureus* en asociación *con Pseudomonas aeruginosa* u otros bacilos gramnegativos.

Tratamiento: una pronta y agresiva exploración quirúrgica para la remoción de todo el tejido necrótico y protección de estructuras subyacentes, en conjunto con el tratamiento antibiótico, son necesarios para limitar esta infección.

> Miónecrosis clostridial

La mionecrosis es generalmente causada por *C. perfringens C. novyi, C. histolyticum, y C. septicum.*

Este tipo de infección está íntimamente asociada a traumatismos.

El inicio de los síntomas en el sitio del traumatismo es abrupto y el síntoma cardinal es el dolor intenso después de las 24 horas del mismo.

En su forma inicial no se observan cambios inflamatorios, pero en horas, se hacen evidenciables áreas de color amarronado bronce o lesiones rojas purpúricas.

La región se torna tensa y exuda una secreción oscura púrpura. Aparece el gas en el interior de los tejidos, que es detectado por la palpación o bien por la auscultación de crepitación, con el apoyo de estetoscopio.

El paciente presenta marcados signos de toxicidad que incluyen taquicardia, fiebre, diaforesis y el rápido desarrollo de fallas orgánicas múltiples.

La mionecrosis clostridial es una infección necrotizante que requiere de cuidado intensivo, medidas de soporte, agresivo desbridamiento quirúrgico y apropiado tratamiento antibiótico.

En el tratamiento de gangrena provocada en forma experimental, se demostró que la tetraciclina, clindamicina y cloramfenicol, en ausencia de oxígeno hiperbárico, fueron más efectivos que la penicilina.

A causa que un 5% de las cepas de *C. perfringens* son clindamicina resistentes, se recomienda la asociación de penicilina más clindamicina.

Infección de herida quirúrgica (IHQ)

La infección de herida quirúrgica es una de las complicaciones más frecuentes en pacientes hospitalizados, luego de una cirugía.

Datos del Sistema de Vigilancia de infecciones nosocomiales de Estados Unidos (NNIS) reporta que las infecciones de herida quirúrgica tienen una incidencia de 3- 38 % en los pacientes con infección adquirida dentro del ámbito hospitalario.

La frecuencia de las infecciones de las heridas quirúrgicas está claramente relacionada con la categoría de la cirugía.

Las cirugías limpias tienen baja tasa de infección, las cirugías contaminadas y sucias, tienen un mayor riesgo de presentar infección.

Las infecciones de heridas quirúrgicas se dividen dentro de dos categorías:

- Infección superficial: es la que involucra el tejido celular subcutáneo dispuesto entre la piel y la fascia superficial muscular subyacente.
  Esta infección ocurre dentro de los 30 días de realizada la cirugía y es documentada por la presencia de al menos uno de los siguientes hallazgos:
- Drenaje purulento.
- Cultivo positivo de muestra obtenida de la secreción o tejido superficial tomado en condiciones asépticas.

- Signos y síntomas locales de reacción inflamatoria (dolor, eritema, rubor, calor y secreción purulenta) de la incisión abierta por el cirujano (a menos que los cultivos resulten negativos.
- Diagnóstico de IHQ por el cirujano o médico asistente.

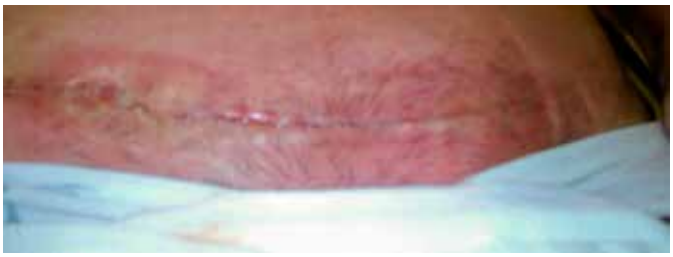


FOTO 7. Paciente con infección de herida quirúrgica post cesárea. Observe edema, eritema y secreción purulenta. En extremo derecho de la herida se observa la presencia de colección.

> Infección incisional profunda

Este tipo de infección se divide en incisional profunda que compromete fascia y músculo e infección de órgano.

Esta IHQ compromete los planos profundos de los tejidos blandos (fascia- músculo) y ocurre dentro de los 30 días de realizada la cirugía o bien dentro del año luego de la cirugía, si una prótesis fue insertada.

Infección de órgano o sitio quirúrgico: los signos y síntomas son los descriptos en IHQ superficial que involucra cualquier parte de la anatomía (órgano o espacio).

El diagnóstico de IHQ se establece por el aspecto de la incisión.

Los signos locales: dolor, edema, eritema y drenaje purulento, están casi siempre presentes.

En pacientes obesos mórbidos o en pacientes sometidos a intervenciones quirúrgicas que comprometen tejidos profundos los signos externos pueden aparecer en forma tardía, pero siempre estarán presentes.

Muchos pacientes con IHQ presentarán fiebre. Esto no siempre ocurre en forma inmediata después de la cirugía y de hecho la aparición de fiebre postoperatoria, nunca está asociada con IHQ.

Las manifestaciones clínicas de IHQ aparecen en la mayoría de los casos, luego del quinto día postoperatorio y en un porcentaje menor se tornan aparentes, luego de la segunda semana del postoperatorio.

Las infecciones más tardías son menos probables, pero las normas de vigilancia deben establecerse hasta los 30 días.

Es casi improbable que cualquier patógeno cause fiebre o signos inflamatorios luego de la 48 horas post cirugía.

Si hay evidencia de infección de partes blandas luego de las 48 horas de una cirugía o traumatismo son siempre provocadas por *Streptococcus pyogenes* o especies de *Clostridium.*

La terapia más importante para la IHQ es la apertura y drenaje de la colección purulenta que será seguida por las curaciones y cambios de apósitos hasta que la herida cure por segunda intención.

Aunque es común que los pacientes reciban antibióticos, cuando la IHQ es diagnosticada, esta práctica tiene poca o nula evidencia que la soporte.

Estudios realizados en pacientes con abscesos subcutáneos no demostraron beneficios para la terapia antibiótica, cuando se la utiliza en combinación con la apertura quirúrgica.

Si bien la mayoría de los libros de textos de cirugía e infectología, discuten extensamente las características epidemiológicas, medidas preventivas y del sistema de vigilancia, no lo hacen con respecto al adecuado tratamiento.

En opinión de expertos en el tema, consideran que en toda IHQ con: - menos de 5 cm de eritema y/o edema y en paciente con signos sistémicos mínimos de infección - Tº mayor de 38,5ºC, - frecuencia cardiaca menor a 100 latidos/minuto, un curso corto de antibiótico de 48 horas puede estar indicado.

La elección del antibiótico es usualmente empírica, pero puede ser soportado con las características de la tinción de Gram y del resultado de los cultivos.

La IHQ, que ocurre después de una cirugía del tracto intestinal o de los genitales, tiene alta probabilidad de tener flora mixta (cocos grampositivos, bacilos gramnegativos con organismos facultativos o anaerobios) Es-

tas infecciones requiere en su abordaje empírico inicial, la cobertura antibiótica de amplio espectro.

Si la cirugía fue limpia, especies de *Streptococcus* spp*, Staphylococcus aureus incluyendo* cepas SAMR deben ser considerados como agentes etiológicos mas probables.

Las incisiones en axila, sitio donde los bacilos gramnegativos se recuperan en forma significativa, en periné donde los anaerobios son frecuentes, los antibióticos elegidos para la infección de estos sitios deberían también ser de amplio espectro.

FOTO 8. Paciente con infección de herida quirúrgica que presenta edema, eritema y secreción hemato-purulenta de salida espontánea. Infección protésica aguda de reemplazo total de cadera.

Infección en pacientes inmunocomprometidos

Los pacientes immunocomprometidos por definición, tienen incrementado riesgo a presentar infecciones generalizadas, por su inhabilidad para controlar las infecciones localizadas.

Las infecciones de piel y de tejidos blandos son comunes y estas son causadas por una diversidad de patógenos.

Estas infecciones demandan una cuidadosa atención y aplicación de medidas preventivas, para proteger la piel de traumatismos innecesarios, maceración y alteraciones de la flora microbiana.

Cuando la infección es desencadenada, es de vital importancia establecer diagnóstico etiológico.

Se debe recordar que estos pacientes reciben atención y medidas diagnósticas invasivas con mucha frecuencia y desarrollarán infecciones por gérmenes multiresistentes provenientes del medio hospitalario.

Las lesiones de piel no deben ser subestimadas por su aspecto inocuo o por pequeña que sea la lesión.

Los pacientes inmunosuprimidos tienen disminuidos todos los signos inflamatorios, secundarios a defectos cualitativos y cuantitativos de los neutrofilos, macrófagos y de los mecanismos de activación de los mismos y también del sistema humoral (inmunoglobulinas secretoras de las mucosas), motivo por el cual, no presentarán lesiones con la clásica tétrada de Celso: aumento de la temperatura local, edema, coloración rojiza y dolor.

Por lo expresado, se requiere de atención cuidadosa de estos pacientes y la impresión clínica siempre debe ser suplementada por abordaje sistémico para el diagnóstico y correcto tratamiento.

Luego de realizar un minucioso interrogatorio para determinar factores concernientes al estado inmunológico y examen físico que permita caracterizar la extensión y repercusión sistémica (infección localizada versus infección diseminada) se deberá recurrir a esquema diagnóstico que permita identificar el o los agentes etiológicos.

La terapia antibiótica debe ser escogida en función de parámetros clínicos, datos epidemiológicos del paciente y epidemiológicos bacterianos del lugar donde recibe la atención, o donde se realizaron los procedimientos invasivos y /o internaciones.

Es mandatorio tomar muestras de sangre para hemocultivos, determinación de antígenos y anticuerpos. El método más útil en presencia de vesículas, pústulas, eritema u otras lesiones de piel, es la toma de muestras

por punción aspiración o bien biopsias de la lesiones para evaluación histológica y microbiológica.

Con estos procedimientos se puede obtener diagnóstico etiológico en el 20 % de los casos.

Los pacientes neutropénicos presentan alteración en la continuidad de piel y mucosas y por lo tanto más riesgo de sufrir infección con flora indígena o colonizante.

Más del 20% de los pacientes con quimioterapia desarrollarán infección de piel y de tejidos blandos, muchas de ellas son por diseminación hematógena de otros sitios: pulmones, tracto gastro-intestinal y senos paranasales.

Además se debe tener presente que determinados microorganismos son más prevalentes para causar infecciones en los primeros 7 días de neutropenia y fiebre y otros son más prevalentes luego de este periodo.

Las infecciones iniciales son usualmente ocasionadas por bacterias, incluyendo cocos grampositivos y bacilos gramnegativos.

Las infecciones tardías son generalmente ocasionadas por bacterias multirresistentes o bien por levaduras u hongos.

Infección inicial (temprana) en pacientes neutropénicos:

Los bacilos gramnegativos que se vinculaban con frecuencia a infecciones en pacientes neutropénicos fueron: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*. Actualmente hay una diversidad de patógenos que son aislados en diferentes centros de tratamiento onco-hematológico.

La incidencia de bacilos gramnegativos como causa inicial de las infecciones ha disminuido en forma significativa en estos últimos 20 años, pero aún permanecen como importantes patógenos en pacientes profundamente inmunosuprimidos (menos de 100 polimorfonucleares), o en pacientes que no han recibido profilaxis antibiótica en el periodo de neutropenia.

Las manifestaciones de infecciones en piel y tejidos blandos incluyen lesiones eritematosas, pápulas, nódulos y ectima gangrenoso.

El ectima gangrenoso es una vasculitis cutánea causada por invasión bacteriana de la pared y adventicia vascular de las arteriolas. La progresión de la lesión lleva a la necrosis de la dermis.

Clásicamente el ectima gangrenoso se reportó como causado por *P. aeruginosa* spp., pero actualmente también se reportan otras especies de *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Serratia* spp., *S .aureus*, *Stenotropho-*

monas maltophilia, Candida spp., y otros hongos como especies de *Aspergillus, Mucor y Fusarium.*

El incrementado uso de profilaxis con fluoroquinolonas o trimetoprima-sulfametoxazol y el aumento en la frecuencia de la colocación de accesos vasculares llevaron al aumento de infecciones por microorganismos grampositivos como ser: *Streptococcus viridans, Staphylococcus aureus, Corynebacterium* spp., *Clostridium* spp., y especies de *Bacillus.*

La infección de piel y partes blandas por estos patógenos se inicia como una erupción maculopapular o bien celulitis.

Los sitios frecuentes de infección son sitios de punción (catéteres, punción aspiración de medula ósea) axilas e ingle o en áreas de alteración de la continuidad de la piel.

El tratamiento antibiótico de amplio espectro debe ser indicado ante los primeros signos y síntomas de infección, incluyendo fiebre.

La selección de antibióticos se hará en función de guías o consensos nacionales e internacionales, sin dejar de tener presente la realidad de la epidemiología del centro donde se encuentre internado el paciente.

El tratamiento antibiótico adecuado puede lograrse con monoterapia con imipenem, meropenem, cefepime y cefalosporinas con actividad antipseudomonal.

La penicilina semisintética como piperacilina tazobactama en combinación con aminoglucósidos o bien una cefalosporina de 3ra generación con la adición de ciprofloxacina también se recomienda.

El tratamiento del neutropénico febril asociado a infección por organismos grampositivos llevó a un incremento en la resistencia de estos patógenos, por lo cual los clínicos consideran que el uso empírico de vancomicina debiera ser parte del régimen inicial de antibióticos.

En realidad la prescripción empírica de vancomicina deberá considerarse en pacientes que portan catéteres implantables o bien en pacientes que se dializan o en aquellos que tienen antecedentes de procedimientos vasculares invasivos, sin olvidar las internaciones frecuentes, antecedentes de uso previo de antibióticos y de la realidad epidemiológica de la institución donde recibe atención médica.

A pesar que las infecciones por organismos grampositivos se incrementa desde hace aproximadamente dos décadas, la administración empírica de vancomicina está injustificada en pacientes con neutropenia y que persisten febriles, más allá de las 96 horas de la terapia antibiótica empírica y se encuentren estables clínicamente y en quienes no se identifico un sitio de infección.

La cobertura empírica para cocos grampositivos debe abarcar la cobertura de *Staphylococcus aureus, Streptococcus viridans, Streptococcus pneumoniae,* SAMR y dependiendo de la epidemiología: *Enterococcus* y *Staphylococcus aureus* vancomicina resistente.

Linezolid o daptomicina constituyen una alternativa, cuando se debe tratar gérmenes resistentes a vancomicina. Se debe tener presente que estos antibióticos tienen toxicidad potencial de tipo hematológico por lo cual, solo está indicado su uso, en pacientes infectados con cocos grampositivos resistentes a vancomicina.

Actualmente se dispone de una nueva alternativa terapéutica como lo es ceftaloridine: cefalosporina de 5ta generación que es activa contra cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino sensible y cepas meticilino resistente incluso muestra acción sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphyloccocus* coagulasa negativa resistente a vancomicina (cepas Visa y daptomicina resistente).

Ceftalorine además es activa contra *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina, también demuestra actividad frente *a Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis* y *Enterococcus faecalis* incluyendo a las cepas vancomicina resistente y se demostró inactiva para la cobertura de *Enterococcus faecium*.

Infección de tejidos blandos por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad (SAMR-CA)

Un problema emergente es el incremento en la prevalencia de infecciones de piel y de tejidos blandos causado por SAMR-CA.

Tradicionalmente SAMR se vinculaba con infecciones adquiridas dentro del ámbito nosocomial.

Las infecciones en pacientes con SAMR-CA difieren de las adquiridas en el ámbito hospitalario en varios aspectos: las cepas de SAMR-CA causan infecciones en pacientes que no presentan los típicos factores de riesgo tales como hospitalización previa, uso previo de antibióticos, antecedentes quirúrgicos, vinculación con personas que presentan estos factores.

Las cepas de SAMR-CA, si bien son resistentes a los antibióticos ß-lactámicos, conservan la susceptibilidad a doxiciclina, clindamicina, trimetoprima-sulfametoxazol, fluoroquinolonas y rifampicina.

Las cepas de la comunidad causaron inicialmente infecciones en brotes y en comunidades cerradas: poblaciones carcelarias, población gay, adictos endovenosos, pero recientemente infectaron a personas que practican deporte de gran fricción, y en los últimos meses se reportan infecciones en pacientes individuales y no vinculados a los grupos de riesgo.

La recurrencia de forunculosis e impétigos, particularmente en personas de alto riesgo y que no responden a la terapia con ß-lactámicos debe hacer sospechar que estas infecciones están causadas por SAMR-CA.

En esta circunstancia se recomienda la toma de muestras de la lesiones para realizar cultivos y determinar la susceptibilidad antibiótica.

Las lesiones fluctuantes deben ser drenadas quirúrgicamente y un tratamiento antibiótico con actividad antiestafilocócica, que no corresponda a la familia de los ß-lactámicos debe ser prescripto,

Previa a la administración de antibiótico se debe realizar la obtención de muestra para cultivo bacteriano y su respectivo antibiograma. El drenaje quirurgico es un recurso esencial para el tratamiento de los forúnculos y absceso. Los antibióticos solo se recomiendan en las siguientes situaciones: presencia de celulitis, infecciones extensas, rápida progresión de la lesión, presencia de repercusión sistémica, infecciones en pacientes inmunocomprometidos y en pacientes que no respondieron con el drenaje.

La mayoría de las cepas son susceptibles a doxiciclina o minociclina.

Es importante recordar que estos antibióticos deben ser evitados en niños menores de 8 años y durante la lactancia.

Clindamicina tiene una excelente actividad, antiestafilocócica, pero presenta una potencial emergencia de resistencia, con infecciones de alto inóculo, causada por cepas de resistencia inducible por eritromicina.

Finalmente linezolid, daptomicina y vancomicina tienen excelente eficacia en infecciones de piel y tejido blando en general y en aquellas generadas por SAMR específicamente.

Vancomicina, teicoplanina, linezolid y daptomicina deben ser reservados para pacientes con severas infecciones y que requieran hospitalización o en quienes no respondan a los intentos para erradicar la infección.

Triometoprima-sulfametoxazol es una buena opción para tratar infecciones severas, incluyendo aquella ocasionada por SAMR.

Quedó demostrado, en un doble trabajo ciego y randomizado, en el cual 47% de las infecciones fueron ocasionada por cepas SAMR, cura en 37 de los 43 pacientes que habían recibido trimetoprima-sulfametoxazol, comparado con 57 de 58 pacientes que habían recibido vancomicina.

Si una fluoroquinolona es elegida para el tratamiento de bacterias grampositivas se debe recurrir a aquellas con aumentada actividad antiestafilococica. Ejemplo: levofloxacina, gatifloxacina, o bien moxifloxacina, pero siempre se debe tener presente la posibilidad de emergencia de resistencia, por lo que es conveniente utilizar la asociación con otro antibiótico para alcanzar sinergia y de este modo evitarla.

En Argentina, en el año 2004 se reportaron 2 casos de SAMR-CA, en el Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología (SADI) un paciente proveniente de la ciudad de Buenos Aires y otro de la provincia de Córdoba, donde se señalaba que estos pacientes no presentaban los factores de riesgos clásicos para vincular las infecciones como adquiridas dentro del ámbito hospitalario.

Al año siguiente se reportan 25 casos (4 de ellos proveniente de la ciudad de Posadas) y los restantes eran habitantes de la ciudad y provincia de Buenos Aires.

Este año, 2008, se presentaron comunicaciones de 49 pacientes y se suman casos detectados en Rosario, Santa Fe y Entre Ríos.

A continuación se realiza un detalle de las características de los pacientes reportados en los años 2004-2006 en Congreso anual de SADI

Población: 76 pacientes (p):

72% (54p) de sexo masculino, edad media 26 años (10 meses a 72 años), 15% (11p) pediátricos, el 75 % (57 p) de la población general presentó como puerta de entrada lesiones en piel, eccema, furunculosis, celulitis y absceso glúteo, 7 pacientes presentaron neumonía, todas asociadas a empiema, 10 pacientes presentaron afectación osteoarticular: artritis y osteoartritis y el 10% de la población presento bacteriemia.

El diagnóstico se realizó en 5 pacientes por artrocentesis, 6 por toracocentesis, 8 por hemocultivo, en 26 pacientes por punción aspiración de piel y/o partes blandas y en los 31 pacientes restantes por combinación de hemocultivos, punción aspiración de partes blandas, articulares.

La susceptibilidad informada en las distintas comunicaciones permite visualizar un perfil: las cepas de SAMR-CA son sensibles en un 80% a clindamicina, 80% a eritromicina, 90% trimetoprima sulfametoxazol, 89% a rifampicina, 73% a gentamicina y 100 % a minociclina, vancomicina y teicoplanina

En un trabajo que incluyó 15 pacientes con infecciones por SAMR-CA se reporta sensibilidad para clindamicina 80 %, eritromicina 80%, gentamicina 73%

La fuerza de los trabajos estuvo sustentada por el análisis genético de las cepas donde se encontrón el gen tipo IV.

Las infecciones por SAMR-CA son cada vez más frecuentes en distintas áreas de nuestro país y las características epidemiológicas corresponden a pacientes jóvenes, predominantemente masculinos.

Las infecciones preponderantes son la de piel y partes blandas y la neumonía complicada y de rápida evolución. La emergencia de estas cepas ocasiona un cambio epidemiológico, en estudios de diagnóstico y un cambio de la conducta terapéutica en infecciones de partes blandas y neumonía severa adquirida en la comunidad.

Recientemente en Argentina se publicó el resultado de un estudio multicentrico de infecciones de piel y partes blandas asociado a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente de la comunidad (SAMR-CA).

Este estudio provee varios hallazgos entre los que se destacan: en infecciones de piel y partes blandas el germen prevalente es SAMR-CA.

SAMR-CA fue encontrado en el 70% de las infecciones de piel y partes blandas de 311 pacientes que no recibian ningún cuidado de salud. Esta estadística es coincidente con la publicada por Estados Unidos.

Esta situación epidemiológica nos coloca en la necesidad de tomar muestra para cultivos bacteriano de todas las lesiones purulentas de infección de piel y partes blandas.

Nos coloca en la necesidad de indicar consideraciones terapéuticas que cubran en forma efectiva la cobertura de SAMR -CA.

Nos obliga a reconsiderar y cambiar las guías de tratamiento para infección de piel y partes blandas.

Este estudio además permitió conocer la predominancia del clon ST-30 SCC mec IV, PVL + spa t 019 entre los pacientes con infecciones de piel y partes blandas provenientes de la comunidad.

Este clon ha desalojado ST5 SCC mec IV PVL + que venía siendo prevalente en el territorio Argentino. El clon ST-30 SCC mec IV, PVL + spa t 019 estaría dotada de enterotoxinas y adhesinas con capacidad para infectar válvulas cardiacas y por consiguiente originar cuadros de endocarditis bacteriana.

La población más afectadas en este estudios son las personas mayores a 50 años y las lesiones más comunes encontradas son forunculosis y abs-

cesos. La leucocidina de PVL + está asociada con la gran purulencia de las lesiones y con la rápida diseminación del clon en grupos cerrados

En este estudio se aplicó en análisis multivariables que demostraron la asociación de lesiones purulentas en personas de más de 50 años son factores de riesgo asociados a la presencia de SAMR-CA

Foto celulitis que comprometa rodilla y tercio superior de pierna Presenta además absceso en zona infrapatelar.

Foto celulitis que comprometa rodilla y tercio superior de pierna. Presenta además absceso en zona infrapatelar.

Infección severa de partes blanda Lesión extensa con formación de absceso con presencia de áreas de necrosis- Agente etiológico SAMR- CA.

Forunculosis en raíz de muslo rodeado por área de celulitis, proceso cicatrizal de otra lesión de forúnculo en zona externa de muslo.

Infección necrotizante que compromete piel, musculo y fascia.

Erisipela de miembro inferior. Se observa área de bordes bien delimitada que separa piel enferma de piel sana. Factor predisponente obesidad.

Piomiositis de los músculos peróneos. Agentes etiológico MAMR-CA.

El laboratorio ■ eduardo pegels

El conocimiento de los integrantes de la microbiota que habitualmente se encuentran en la primera barrera de defensa del sistema innato de defensa del hombre, la piel y las mucosas, nos posibilitara la comprensión de los mecanismos que están involucrados en las infecciones de este tejido o las que se producen a partir de él.

Sabemos que existe un delicado equilibrio ecológico entre la piel y mucosas del huésped con los microorganismos asociados, estableciéndose una suerte de cooperación para cumplir funciones que son fundamentales para la sobrevivencia de ambos integrantes de este sistema, sin existir agresión.

Si por alguna razón de naturaleza física o química (heridas, traumatismos, calor, frío, drogas) se produce la ruptura de este balance, dañando o invadiendo esta primera barrera, arrojará como resultado una infección en el sitio de la lesión o la invasión al tejido subyacente con diseminación, dando lugar a graves y severos cuadros infecciosos. En general se ven involucradas la piel, el tejido celular subcutáneo, la fascia y el músculo esquelético.

Innumerables investigaciones clínicas hacen referencia a la microbiota habitual o normal de la piel, se mencionan diversos integrantes del mundo microbiano como pertenecientes a este hábitat, se citan como ejemplos a: *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Mycobacterium* spp., hongos y levaduras.

Siguiendo esta línea de razonamiento podemos sospechar o ver reflejados los tipos bacterianos que habitan en una determinada zona de la piel acorde con el área adyacente a la misma, especialmente las cercanas a mucosas (mayor porcentaje de humedad) u orificios (boca, ano, meato uretral, narinas, vagina, conducto auditivo entre otros).

Reconocer la existencia de estas bacterias, habitantes habituales de la piel y mucosas, nos obliga a ser muy precavidos a la hora de iniciar estudios microbiológicos de lesiones superficiales de la piel o heridas quirúrgicas, escaras, quemaduras, trasplantes, etc.

Por los motivos antes citados desterramos la utilización del hisopado para la toma de muestra en este tipo de estudios, lo que se apreciará a lo largo de este capítulo.

Infecciones no necrotizantes

Impétigo- ectima - erisipela - celulitis- foliculitis- forúnculo abscesos- úlceras

Impétigo: dentro de los microorganismos más frecuentemente involucrados encontramos a:

- *Streptococcus grupo* A*,* típicamente después de una lesión leve.
- *Staphylococcus aureus* previa colonización nasal. En el 10% de los casos se puede presentar como impétigo bulloso con formación de ampollas con líquido amarillo claro que al romperse dejan una superficie húmeda.
- *Streptococcus grupo* B*,* menos frecuente pero se recomienda su búsqueda en todas las lesiones de PPB, sobre todo si recordamos que SGB está también asociado a infección urinaria, infección de herida quirúrgica post-cesárea, sepsis puerperal y actualmente se incrementa su asociación con severas infecciones invasivas en adultos en general y en la embarazada, como neumonía, peritonitis, endocarditis, meningitis, osteomielitis, artritis, celulitis necrotizante, fascitis necrotizante, entre otras.

Rara vez es necesaria la realización de una punción aspiración para cultivo, o de una biopsia cutánea para el diagnóstico.

Esta suele indicarse en situaciones especiales, tales como pacientes inmunodeficientes, lesiones relacionadas con inmersión en aguas y mordeduras animales.

Celulitis: El diagnóstico microbiológico de laboratorio está especialmente indicado en pacientes inmunocomprometidos, falla terapéutica y en el caso de sospechas de agentes etiológicos distintos a los predecibles.

Sabemos que la punción-aspiración(PAS) de las celulitis son positivas en 20-30% de los casos y las especies bacterianas predecibles, a pesar de esto, el aumento del número de casos por SAMR-CA, obliga a obtener material para cultivo.

En pacientes pediátricos se deben realizar hemocultivos en lactantes menores de 6 meses, en pacientes con compromiso del estado general, huéspedes inmunocomprometidos y en caso de celulitis periorbitaria sin puerta de entrada cutánea (la complicación meníngea era de cerca del 20% en celulitis por *Haemophilus influenzae"*b*"* (Hib). El rédito de los hemocultivos es menor del 5%.

Recordar que los microorganismos asociados a celulitis, aunque presentes, se encuentran usualmente en relativamente bajas concentraciones.

Foliculitis: El diagnóstico bacteriológico de laboratorio está especialmente indicado en pacientes inmunodeficientes y necesario solo en formas rebeldes o atípicas y fallas de tratamiento o recurrencias.

Forúnculo: SAMR-CA con todos sus factores de virulencia pueden transformar esta patología simple en una situación clínica complicada, por lo que es necesario el diagnóstico de laboratorio, especialmente en la forunculosis recurrente.

Abscesos cutáneos: Generalmente son polimicrobianos, *S. aureus* es el primer agente causal, aislándose como agente único solo en el 20 a 30% de los casos.

Las bacterias anaerobias como *Propionibacterium acnés*, *Peptostreptococcus* spp. *Bacteroides* spp. *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* o *Actinomyces*, participan con menor frecuencia, aunque casi siempre asociadas a otros microorganismos según sea la localización de la lesión, por ejemplo, en la región perineal se suelen aislar *Bacteroides* spp., asociado a enterobacterias y cocos positivos aerobios. En usuarios de drogas inyectables, como heroína, se han descripto infecciones por *Clostridium botulinum,* en especial en mujeres por la mayor tendencia a inyectarse en los tejidos blandos antes que en las venas.

En estos casos la muestra más útil es el suero donde en el 93% de los casos puede detectarse la presencia de toxina botulínica.

El cultivo anaeróbico de las muestras obtenidas por punción aspiración (PAS) tiene menor sensibilidad (aproximadamente 63%).

También en estos pacientes (usuarios de drogas endovenosas) son más frecuentemente recuperados anaerobios de la microbiota oral.

Esto podría deberse a la costumbre de estos a mojar el algodón y lubricar la aguja con saliva, como paso previo a la punción.

La muestra para el diagnóstico microbiológico es de punción aspiración con los cuidados que comentaremos mas adelante.

Piomiositis: La muestra de PAS es la indicada para esta patología de localización muscular.

Ulceras cutáneas: El desafío del laboratorio de bacteriología en la evaluación microbiológica de los enfermos con esta situación clínica, es definir si las bacterias aisladas son colonizantes o están ocasionando una infección.

Por esto resulta imprescindible analizar cuidadosamente qué tipo de muestras son las representativas y pueden influir en la toma de decisiones terapéuticas.

Recordar que se desaconseja la toma de hisopados de secreción superficial para el cultivo.
Recordar que la Punción Aspiración percutánea: es un método más representativo que el hisopado y por lo tanto se recomienda.
Recordar que la Biopsia tisular es un procedimiento con alta efectividad diagnóstica y por lo tanto de elección.
Recordar que cuando se aíslan microorganismos constituyentes de la biota habitual de piel y mucosas, como *Corynebacterium* **spp. y otros, se recomienda informar "Desarrollan bacterias de la microbiota habitual de piel".**
Recordar que cuando se recuperan microorganismos considerados oportunistas, se recomienda el diálogo con el médico tratante, a fin de investigar la forma de la toma de muestra y datos de la clínica del paciente.
Importante es resaltar que los cultivos de tejido del fondo de la úlcera o de hueso deben ser interpretados en el contexto del cuadro clínico y/o la evidencia histolópatológica concomitante. Mayor número de tomas profundas contribuye a incrementar la especificidad diagnóstica
Importante es tener en cuenta que todas las muestras deben ser enviadas lo más rápidamente al laboratorio.

Destacamos *Staphylococcus schleiferi,* citado en párrafos anteriores como asociado a infecciones especialmente agresivas (cerebro, huesos, aparato urinario, sistema circulatorio, prótesis, y también a infecciones de heridas), equiparables a las causadas por *Staphylococcus aureus*. Su patogenia se encuentra en etapa de dilucidación, por lo que la identificación correcta de estos aislamientos tiene particular importancia.

La propuesta de identificación bioquímica es presentada al final de esta sección con otros estafilococos que comparten la necesidad de ser adecuadamente identificados.

Diagnóstico microbiológico de las infecciones de heridas

Obtencion de la muestra

La forma de obtener una muestra es de vital importancia ya que de ello depende arribar a un diagnostico bacteriológico correcto.

Elegir la zona más representativa de la infección evitando la contaminación con la microbiota habitual de la piel o tejido adyacente.

Obtener las muestras antes de instaurar tratamiento antimicrobiano.

Tomar muestras solo de aquellas lesiones que presenten signos clínicos de infección o que no evolucionen a la cicatrización después de un lapso largo de tiempo.

Enfatizar en la higiene y desinfección del área previo a la toma.

La muestra de tejido o la obtenida por aspiración son las mejores desde el punto de vista microbiológico. Permiten realizar estudios cuantitativos, muy ˙útiles a la hora de determinar el momento óptimo para realizar un injerto cutáneo o suturar una herida abierta.

Las muestras de trayectos fistulosos no representan la verdadera etiología en casos de osteomielitis subyacente y no se recomienda tomarlas.

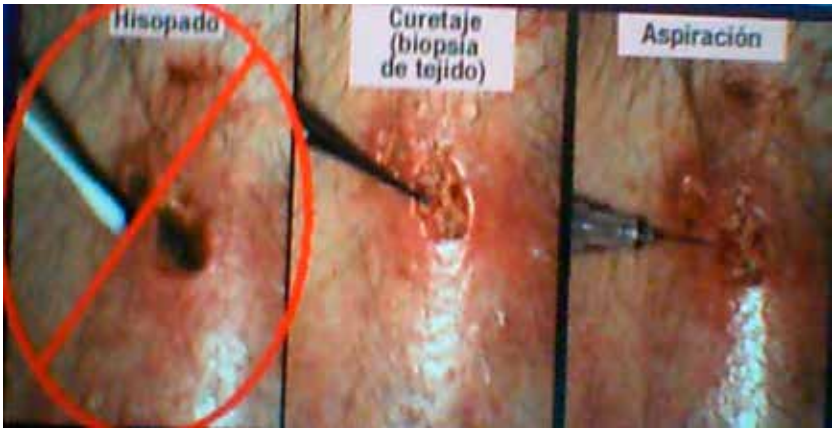
En enfermos con infección grave o repercusión sistémica se recomienda siempre acompañar esta muestra con una serie de hemocultivos.

> Heridas abiertas

Punción Aspiración (PAS)

Realizar la punción a través de piel periférica a la úlcera colocando la aguja a 45º, previa desinfección de la piel con clorhexidina al 2% o etanol de 70º, seguidamente pintar con povidona iodada al 10%, dejar secar y eliminar el iodo con etanol, seleccionando la zona con mayor tejido de granulación (ausencia de restos inflamatorios y necróticos de tejidos). Si no se consigue muestra, inyectar 0,5 ml de solución fisiológica estéril y aspirarlo posteriormente.

Expulsar el aire contenido en la jeringa y obturar la aguja con tapón de goma, por la probabilidad de estar ante una infección causada por bacterias anaeróbicas las que deben ser transportadas y conservadas a temperatura ambiente.



> Biopsia tisular y/o curetaje

En este tipo de muestras debemos evitar las zonas necróticas, para ello, previamente, se deberá realizar el desbridamiento quirúrgico y lavar ‘’a chorro’’ con suero salino estéril. Se recomienda obtener suficiente muestra, del fondo limpio de la úlcera. Estas pueden obtenerse mediante PAS con aguja fina o con sacabocados también llamada “punch”), mediante procedimiento quirúrgico abierto o utilizando una cureta para raspar la base limpia de la ulcera.

Biopsia de herida Punch

Cureta

Abscesos cerrados

Previamente se debe realizar la descontaminación de la piel que cubre el absceso tal como se describe para PAS, luego proceder a aspirar el pus con jeringa y aguja, preferiblemente hacerlo a través de una zona de piel sana. En caso de no obtener muestra proceder en idéntica forma a la indicada para el método de punción aspiración descripto precedentemente. Enviar al laboratorio antes de los 30 minutos o sino Inocular vial para cultivo de bacterias anaerobias.

Biopsia de herida

Pus

Se recomienda aspirar el pus de la zona mas profunda de la herida con jeringa y aguja, previa descontaminación de la piel y bordes de la herida. La muestra se transporta de igual modo que la anterior.

> Quemaduras

Se recomienda realizar dos incisiones paralelas de unos 1-2 cm. de longitud separadas 1,5 cm.; luego, con un bisturí y pinzas estériles, obtener· una muestra lo suficientemente profunda como para llegar hasta el tejido viable.

En determinadas heridas (como las quemaduras o las heridas crónicas) es aconsejable recoger más de una muestra, de diferentes zonas del sitio, porque una única muestra puede no reflejar todos los microorganismos productores de la infección.

Transporte y conservación de la muestra

Una toma adecuada de la muestra es fundamental para lograr una recuperación óptima de bacterias involucradas en estos procesos.

Los contenedores de muestras deben ser estériles, con cierre hermético, apropiados en tamaño y que permitan mantener condiciones adecuadas de humedad. Se enviaran· inmediatamente al laboratorio. Las biopsias y tejidos, si son fragmentos pequeños, se inoculan en un vial de transporte para anaerobios. Si son más grandes, se introducen en contenedores estériles sobre una gasa estéril humedecida en suero salino estéril para evitar su desecación. En el caso de muestras óseas, se recomienda recoger varios fragmentos y enviarlos por separado en contenedores estériles diferentes Si esto no ocurre se debe prestar especial atención a la preservación de la viabilidad de las bacterias aerobias y anaerobias que pudiesen estar involucradas, para lo cual se deben utilizar medios de transporte prereducidos.

Mantenerlos siempre a temperatura ambiente ya que a bajas temperaturas aumenta la difusión del oxígeno, lo que resulta perjudicial para los anaerobios.

No preincubar porque aumenta la proliferación bacteriana.

> Procedimientos de siembra de las muestras

El laboratorio someterá la muestra a un procesamiento en función de sus protocolos de trabajo y de la información que aporta el médico tratante y el enfermo.

Es imprescindible acompañar a la muestra con la solicitud médica con datos del paciente, unidad de internación, tipo y técnica de obtención, diagnóstico del enfermo o patología de base, tratamiento instaurado, toma de antimicrobianos y todo otro dato de interés que se pueda aportar.

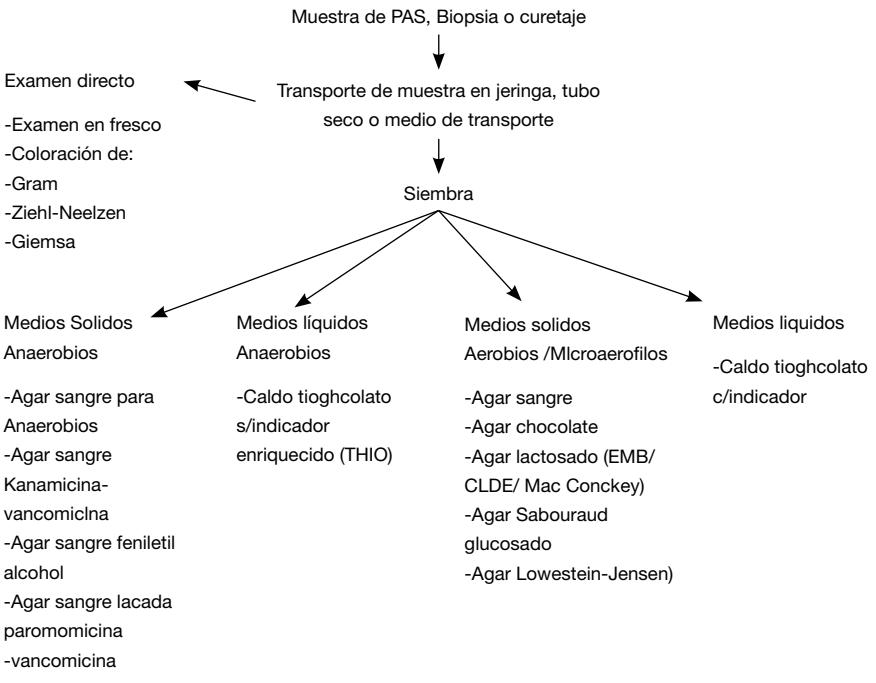
Si las muestra lo permiten, se procederá a la obtención de pequeños fragmentos de la misma utilizando bisturí o tijera estéril o vidrio estéril cortado en pequeños trozos o molido, utilizando un mortero al que se le

agrega el tejido en cuestión, una pequeña cantidad de vidrio molido o trozado, luego se agrega caldo de cultivo para la homogenización y se procesa como se describe más adelante. En el caso de fragmentos óseos se inocularan directamente en caldo de enriquecimiento. Si hay fragmentos de tejidos blandos se procederá a separarlos del tejido duro y se procesaran, en forma paralela, como otra muestra.

Las muestras se inocularan sucesivamente en los medios de cultivo seleccionados comenzando por los medios sólidos (primero los medios para cultivo de anaerobios), seguidamente los caldos y finalmente se procede a realizar los extendidos sobre portaobjetos para la tinción de Gram y otras que sean pertinentes.

La preparación del extendido sobre porta de este tipo de muestras es dificultosa, es recomendable incluir la muestra entre dos portas presionando y desplazando ambos entre sí hasta conseguir una extensión fina.

Esquema mínimo de siembra de muestras de piel y partes blandas



De acuerdo al tipo de muestra se deberá combinar el uso de algunos o todos los medios de cultivo.

Las muestras se conservarán refrigeradas durante 7 días por si son necesarios estudios complementarios.

Utilidad de los medios de cultivos primarios

Medio	Objetivo principal
Agar sangre CDC	Medio no selectivo para aislamiento primario de todos los tipos de anaerobios encontrados en materiales clínicos
Agar sangre Feniletil alcohol	Selectivo, inhibe los bacilos entéricos (*Proteus*) y el crecimiento confluente de algunos clostridios Crecen bien bacterias Gram(+) y G(-) anaerobias.*2 Puede usarse CNA (agar colistin- ac. nalidixico) como alternativa
Agar sangre kanamicina-vancomicina / paromomicina-vancomicina	Selectivo para especies de *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium* y *Veillonella* de muestras clínicas que contienen bacterias aerobias y anaerobias. Vancomicina inhibe bacterias Gram (+) en general y kanamicina Gram(-) anerobios facultativos. Paromomicina es útil para anaerobios facultativos resistentes a kanamicina Ej. algunas cepas de *Klebsiella*.
Caldo Tioglicolato enriquecido (THIO)	No inhibitorio útil para actinomicetos. Promueve buen desarrollo de Bacterias anaerobias, anaerobias facultativas y aerobios. Se puede agregar medio carne picada como complemento en el aislamiento de especies de *Clostridium* y cromatografía en fase liquida y gaseosa de identificación.

La preparación de los medios de cultivo correspondientes a los cultivos primarios para anaerobios se describen al final de esta seccion.

Para tener una orientación rapida de los procedimientos que debemos realizar, en funcion de las muestras obtenidas para el estudio microbiologico de los distintos tipos de heridas, proponemos la Tabla N° 1.

Tabla N°1. Modo de procesamiento en función de la herida.

Infección	Tipo de muestra	Cultivo cualitativo		Cultivo semicuantitativo		Cultivo cuantitativo	
		Gram	Cultivo	Gram	Cultivo	Gram	Cultivo
Herida quirúrgica	Invasiva	X	X	X	X	X	X
Heridas agudas	Invasiva	X	X	X	X		
Heridas crónicas, ulceras vasculares y por presión	Invasiva	X	X	X	X	X	X
Quemaduras	Invasiva					X	X
Pie diabético	Invasiva	X	X				

Adaptado de: Burillo, Moreno A, Salas C. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos. Prot. SEIMC-2006.

A la herida aguda no hacemos cuantitativo, solo a las heridas de más larga evolución.

Para tener una orientación de las condiciones de cultivo y tiempo, se pueden seguir las pautas consignadas en la Tabla 2.

Tabla 2.- Condiciones y tiempo de cultivo

Medio de cultivo	Primera lectura	Lectura diaria	Recuento	Tiempo de incubación	Subcultivo
Aerobios (Muestras invasivas)	24 hs	si	48 hs	15 dias	1
Anaerobios	48 hs	si	48hs	5-7 dias	1
Caldo de enriquecimiento	24 hs	si	-	7 dias	2
Mordeduras	24 hs	si	48 hs	15 dias	1
Actinomicosis	48 hs	si	-	2-4 sem.	1

1- Se debe valorar oportunamente los medios a utilizar de acuerdo a los microorganismos sospechosos

2- Cuando se observa turbidez subcultivar a medios sólidos. y hacer coloración de Gram

Adaptado de : Burillo A, Moreno A, Salas C. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos. Prot. SEIMC-2006.

Metodos de siembra

Los métodos que se pueden utilizar para realizar la valoración microbiológica de las muestras pueden ser: Cultivos cualitativos, semicuantitativos y cuantitativos.

Cultivo cualitativo

Se siembra la muestra sobre uno de los cuadrantes de cada placa; con un asa estéril, se realizan estrías desde la zona de descarga (cuadrante 1) hacia el resto de los cuadrantes de la placa (cuadrantes 2, 3 y 4. Se deben utilizar los siguientes medios de cultivo: agar para anaerobios, agar chocolate, agar sangre, agar EMB/MacConkey/CLDE, agar Sabouraud; en las muestras obtenidas mediante aspiración se debe añadir un caldo de enriquecimiento Ej. caldo tioglicolato, por último, se prepara la extensión sobre un porta para tinción de Gram.

Las muestras de biopsias y tejidos se trituraran y homogeneizarán previamente en 1-2 ml de caldo de enriquecimiento durante 30 segundos y se inocula 0,1 mL del homogeneizado en los medios de cultivo.

Las muestras de gran tamaño no precisan trituración, se debe fraccionar la muestra con bisturí o tijera estéril, realizar una impronta con el borde de la muestra recién cortado en los diferentes medios y la extensión sobre porta para tinción de Gram. Las muestras muy pequeñas pueden inocularse directamente en el caldo de enriquecimiento.

Cultivo semicuantitativo

Las muestras se siembran inoculando con la misma técnica descripta para los cultivos cualitativos, los 4 cuadrantes de una placa con medio de agar chocolate, agar para anaerobios, , agar sangre aerobio, agar EMB/MacConkey/CLDE, agar Sabouraud; y en las muestras obtenidas p aspiración se debe añadir un caldo de enriquecimiento Ej. caldo tioglicolato y se prepara la extensión sobre un porta.

Se interpreta de la siguiente manera: crecimiento en el primer cuadrante, se correlaciona con un recuento de $\geq 10^3$UFC/g, segundo cuadrante, con un recuento de $\geq 10^4$ UFC/g; tercer cuadrante $\geq 10^5$UFC/g y en el cuarto cuadrante con un recuento de $\geq 10^6$UFC/g.

Cultivo cuantitativo

Se realiza con muestras de tejidos y biopsias de heridas y quemaduras.

El grado o magnitud de contaminación se relaciona en forma directa con el riesgo de sepsis a partir de una herida, muy ˙útiles a la hora de determinar el momento óptimo para realizar un injerto cutáneo o suturar una herida abierta.

Es muy importante utilizar el cultivo cuantitativo (UFC/gr de tejido) en el tratamiento de pacientes con quemaduras graves.

Para el diagnóstico de infección, hace falta hacer un cultivo cuantitativo de la quemadura y además la valoración histológica de la misma. La combinación de ambos estudios es la técnica de referencia o Gold standard. Se confirma la presencia de infección invasiva de la quemadura cuando se aíslan más de 10^5UFC/g de bacterias, y por histología se confirma la presencia de microorganismos en la dermis por debajo de la escara y alrededor de los tejidos sanos adyacentes.

El procedimiento a seguir para esta técnica se describe a continuación:

- Cortar un trozo de tejido de manera aséptica sobre un recipiente estéril previamente pesado ej. Placa de Petri.
- Determinar el peso del tejido, restando el peso de la placa de petri vacía del peso total.
- Colocar la muestra en 2 ml de caldo nutritivo o solución salina fisiológica en un mortero para tejido y se macera hasta homogeneizar.
- Inocular 0,1 mL del homogeneizado (dilución 10^{-1}) en los medios de cultivo.
- Realizar 3 diluciones seriadas del homogeneizado (0,5 mL en 4,5 mL de suero salino estéril y obtener tres diluciones, 10^{-1}, 10^{-2} y 10^{-3}. Sembrar con pipeta estéril 0,1 mL de cada una de estas diluciones en medios de agar chocolate y agar EMB/McConkey/CLDE (total 6 placas). Se obtiene finalmente cada placa con la dilución 10^{-2}, 10^{-3} y 10^{-4}.
- Se pueden hacer cultivos cuantitativos para anaerobios, pero los resultados son peores porque las diluciones seriadas dificultan su crecimiento. El recuento cuantitativo se obtiene a partir de la placa de recuento en la que se observe un crecimiento de entre 30 y 300 colonias de, al menos, un único morfotipo.
- Calcular UFC/g de la muestra se empleando el siguiente cálculo

$$UFC/g = \frac{N° \text{ colonias x 2 (dilución homogeneizado) x dilución placa}}{\text{Peso biopsia}}$$

La extensión para la tinción de Gram se prepara a partir del homogeneizado: se extienden 0,01 mL (con un asa calibrada de 10 µL) sobre un ·área del portaobjeto de 1 cm. de lado. Se recomienda examinar al menos 10 campos con objetivo de gran aumento (100X). La visualización de microorganismos se correlaciona con una carga bacteriana en el tejido de $\geq 10^5$UFC/g.

Valoracion de la coloración de gram

Utilizamos la coloración de Gram como método de cribado para valorar la calidad de las diferentes muestras clínicas en materiales respiratorios, urinarios y ahora en muestras de heridas, basado en la presencia de polimorfonucleares como indicador de inflamación o infección y a las células epiteliales como indicador de contaminación superficial de la muestra. Orienta a que microorganismos se dará valor en cultivos polimicrobianos y de acuerdo a la morfología decidir o no nuevas conductas en el procedimiento de cultivo (agregado de medios especiales, incubar en determinadas condiciones o prolongar el tiempo de incubación).

Para tomar una decisión sobre los pasos a seguir de acuerdo al tipo de muestra, los resultados de la coloración de Gram y de los cultivos, se puede consultar la Tabla 3.

Tabla N°3. Valoracion del gram y del crecimiento en los medios de cultivo.

	Procedimiento cualitativo	Procedimiento semicuantitativo	Procedimiento cuantitativo
Técnica diagnostica	Muestras invasivas (biopsias y tejidos)	Herida quirúrgica y otras muestras (obtenidas por punción con aguja y jeringa)	Muestras invasivas(biopsias y tejidos)
Tinción de Gram	Informar todos los morfotipos observados	La visualización de microorganismos se correlaciona con una carga bacteriana de $\geq 10^6$ UFC/g (significativo)	Observar al menos 10 campos a 100X. La visualización de microorganismos se correlaciona con una carga bacteriana de ≥105 UFC/g (significativo)
Cultivo de aerobios	Si la toma se realiza sin contaminación superficial, ID+AB[1] de todos los microorganismos aislados	ID+AB[1] de los microorganismos que se aìslen en los cuadrantes 3º y 4º,que se correlaciona con cargas bacterianas de $\geq 10^5$ UFC/g y 10^6 UFC/g, respectivamente (significativo)	Hacer el recuento (n) en la placa en donde se aìslen entre 30-300 UFC de al menos un ˙unico morfotipo. Cálculos: n x 2 (dilución original) x dilución placa / peso biopsia Valoración: Recuentos de $\geq 10^5$ UFC/g se consideran significativos (infección o ausencia de cicatrización del injerto). Identificación a nivel de género y especie
Cultivo de anaerobios	Si la toma se realiza sin contaminación superficial, identificación presuntiva de los microorganismos aislados	Identificación presuntiva de los microorganismos que se aíslen en recuento significativo (el recuento se hace en forma semejante a los microorganismos aerobios)	Identificación presuntiva de los microorganismos que se aíslen en recuento significativo (el recuento se hace en forma semejante a los microorganismos aerobios)

1- ID: Identif. A nivel de genero y especie; AB: antibiograma
UFC : unidad formadora de colonias
Adaptado de : Burillo A, Moreno A, Salas C. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2007; 25(9): 579-86.

Para la identificación de los microorganismos involucrados en cada caso se utilizaran las pruebas bioquímicas correspondientes a cada grupo bacteriano, obtenidas de tablas y manuales de laboratorio.

El resumen de los procedimientos para la toma y procesamiento de las muestras de infecciones no necrotizantes se pueden consultar en la Tabla Nº 4.

Infecciones necrotizantes

Gangrena sinergística progresiva: *Staphylococcus aureus* y *Estreptococos* no hemolíticos microaerofílicos, son los agentes principales. También son identificados en menor cuantía *Proteus* spp., bacilos gramnegativos.

Mycobacterium kansasii, *M. chelonae* y *M. smegmatis* se encuentran involucrados en inmunodeprimidos tratados con esteroides.

Celulitis clostridial: *Clostridium perfringens* es el agente etiológico de mayor frecuencia, en menor medida puede estar involucrado *Clostridium septicum* y otros clostridios, así como flora anaeróbica facultativa.

Recordar que la observación de esporos es rara en *C. perfringens*, y que estos microorganismos pueden perder su coloración por lo que es importante detenerse en la observación de su morfología, de bacilos grampositivos gruesos con extremos rectos.

Recordar al hacer el informe preliminar del directo remarcar la "presencia de bacilos Gram positivos compatibles morfológicamente con *Clostridium* spp.". y consignar, si hubiere, la flora acompañante.

Recordar que las siembras anaeróbicas deben ir acompañadas de siembras aeróbicas incubadas en atmósfera de CO_2 para cubrir otros microorganismos probables.

Celulitis no clostridial anaeróbica: anaerobios no esporulados, grampositivos y gramnegativos son los agentes etiológicos- no *Clostridium*- participando o no en flora mixta junto a *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., enterobacterias, *Aeromonas* spp. Y otras. *Peptostreptococcus* spp. *Bacteroides* spp., se encuentran entre los anaerobios más identificados.

Recordar la importancia de que la muestra sea transportada al laboratorio en condiciones anaeróbicas.

Recordar que la coloración de Gram tiene gran importancia en estas patologías, ya que se informa tinción, disposición y morfologías compati-

Tabla Nº 4. Resumen de metodos de toma y procesamiento de muestras de infecciones no necrotizantes.

Infecciones no necrot.	Impétigo	Impétigo bulloso Ectima	Celulitis Erisipela	Foliculitis	Forúnculos Abscesos cutáneos	Úlceras cutáneas
Toma de muestra	Limpiar la zona con povidona yodo, levantar las costras superficiales y raspar o hisopear la base de la lesión.	Aspirar con jeringa. Levantando las costras superficiales Se puede inyectar pequeño volumen de solución fisiológica.	P.A.S. (punción aspiración) del borde de la lesión. Obturar la aguja En celulitis acompañar de hemocultivos.	P.A.S en caso de escaso material inyectar solución fisiológica estéril y aspirar	P.A.S, tomar hemocultivos en casos de carbunclo.	P.A.S. de la zona que rodea la escara, o del material profundo accediendo por debajo del tejido necrótico. No utilizar hisopos
Procesam.	Es de utilidad el examen microscópico previa coloración de Gram La siembra en agar sangre es suficiente para estos materiales. En caso de pacientes que reciben antibióticos agregar un medio líquido (infusión cerebro corazón suplementado, caldo tioglicolato).	Seguir las indicaciones para impétigo. Agregar cuando se sospecha celulitis agar chocolate para la recuperación de Haemophilus, y cultivos anaeróbicos indicaciones para impétigo. Agregar cuando se sospecha celulitis agar chocolate para la recuperación de *Haemophilus*, y cultivos anaeróbicos	El examen directo es de importancia aquí, en especial para la búsqueda de agentes micóticos. Sembrar en: agar sangre-agar chocolate-caldo infusión cerebro corazón suplementado o tioglicolato.	El examen directo es de importancia aquí, en especial para la búsqueda de agentes micóticos. Sembrar en: agar sangre-agar chocolate-caldo infusión cerebro corazón suplementado o tioglicolato.	En forúnculos la siembra en agar sangre es suficiente. En abscesos cutáneos es importante la coloración de Gram Sembrar en agar sangre, un medio lactosado si se sospechan bacilos Gram negativos y medios para anaerobios.	Deben tomarse cultivos para aerobios y anaerobios con los recaudos ya señalados antes.

bles con presencia o no de anaerobios Que orienta "prima facie" a la etiología y tratamiento empírico inicial.

Mionecrosis clostridial (gangrena gaseosa): *Clostridium perfringens* es el principal agente etiológico, siguiendo *C. septicum* y *C. novyi.*

Recordar que es una "Urgencia médica" y se debe informar lo antes posible porque es altamente fatal.

Recordar en muestra de punción o tejidos informar "presencia de bacilos grampositivos compatibles morfológicamente con *Clostridium* spp."(si se observan al microscopio Bacilos Grampositivos o Gram variables con extremos romos, gruesos con forma de "vagón de carga" sin esporos y ausencia de leucocitos)

Tomar todos los recaudos vistos en las patologías anteriores para realizar cultivos aerobios y anaerobios.

El *Clostridium perfringens* es fácil de recuperar en agar sangre con y sin agregado de suplementos. Desarrolla rápidamente obteniéndose colonias grandes en las primeras 18-24 hs a 35° en anaerobiosis.

Para su identificación presuntiva procederemos a la realización de pruebas de laboratorio relativamente sencillas cuya metodología se comenta al final de esta seccion:

a. Observar doble zona de hemolisis en el agar sangre ovina.
b. Producción de lecitinasa en agar yema de huevo
c. Prueba de CAMP-reversa

Fascitis necrotizante

Recordar que *S. pyogenes* y *Bacillus cereus* son otros agentes de la fascitis necrotizante, con clínica semejante a la clostridial.

Recordar que el examen directo tiene gran importancia en ambos tipos: en la polimicrobiana por ser de etiología no predecible y la probable participación de anaerobios, lo que obliga consignar en el informe la coloración ,morfología y disposición compatible con la presencia de bacterias anaerobias (se observará al microscopio bacterias fusiformes, pleomorficas , de coloración débil y distribución polar, cocos positivos de distribución y tamaños irregulares) y en la monomicrobiana por las características morfológicas y tintoriales de los Gram positivos el *Streptococcus pyogenes* (que se presentan abundantemente en diplos y cadenas) o *Staphylococcus aureus*.(agrupados en racimos).

Recordar la urgencia de diagnóstico que requiere esta patología, por lo que un examen directo aún de material aspirado de las ampollas de piel que aparecen o de una pequeña biopsia de la zona afectada, antes del debridamiento, es un gran aporte para la conducta a seguir.

Recordar que como toda infección con impacto sistémico debe acompañarse con muestras de hemocultivo

Infecciones del pie diabético: Es el *Staphylococcus aureus* el agente etiológico principal de las infecciones leves, aquellas que no comprometen el miembro, por ser superficiales, sin compromiso óseo ni articular y no estar acompañadas de toxicidad sistémica.

Bacilos gramnegativos y estreptococo y microbiota anaeróbica suele encontrarse raramente.

Diferentes microorganismos, aerobios y anaerobios: *S. aureus, Streptococcus* grupo B, *Bacteroides* spp., bacilos anaerobios Gram negativos pigmentados y a veces *Clostridium* spp., se involucran en las infecciones graves, las que comprometen el miembro por afectar severamente hueso, articulaciones y compromiso general con marcada toxemia, infecciones éstas que pueden poner en riesgo la vida del paciente.

La recuperación de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp., ocurre en muestras superficiales de úlcera y no en tejidos profundos en pacientes que han internados, por lo que se asume como contaminación.

Recordar no tomar muestras de ulceras sin signos de infección

Recordar no tomar muestras con hisopos de la superficie de la ulcera, habitualmente contaminados

Recordar que el curetaje o biopsia de la base de la lesión luego del desbridamiento, como asi también la punción de abscesos si los hubiere son buenas muestras para cultivo.

Recordar que la muestra ósea por biopsia quirúrgica o punción a través de la piel sana, es excelente para estudiar microbiológicamente la osteomielitis asociada.

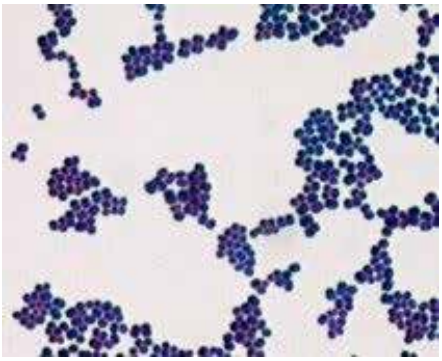
Los procedimientos para la toma y procesamiento de las muestras de infecciones necrotizantes se pueden consultar en la Tabla Nº 5

Tabla Nº 5. Resumen de metodos de toma y procesamiento de muestras de infecciones necrotizantes.

Infecciones necrotizantes	Gangrena sinergística progresiva	Celulitis clostridial	Celulitis no clostridial anaeróbica	Mionecrosis clostridial (gangrena gaseosa)	Fascitis necrotizante	Infecciones del pie diabético
Toma de muestra	P.A.S. y biopsia de las úlceras	Punción del centro de la lesión y tejido subcutáneo que se obtiene en quirófano durante el desbridamiento.		Por punción o biopsia de tejido muscular. Acompañar de hemocultivos.	En ambos tipos de fascitis las muestras se obtienen en quirófano, por punción del centro de la lesión o bien tomando trozos de tejidos necrosados. Acompañar de hemocultivos.	Muestra ideal: biopsia de tejido necrótico profundo, ó toma a través de la úlcera, obtenida en quirófano. Evitar contaminación con flora de piel y la aspiración de tejidos profundos por su baja recuperación de agentes etiológicos.
Procesamiento	Es importante la coloración de Gram. Agregar coloración de Ziehl-Neelsen.	La observación de esporos de C. *perfringens* es rara, buscar bacilos Gram positivos gruesos con extremos rectos y presencia de flora anaeróbica.		Ausencia de leucocitos y gran cantidad de bacilos Gram positivos con las características de *C. perfringens*, sin esporos, es el hallazgo frecuente.	El examen directo tiene gran importancia en ambos tipos de fascitis	Es importante la coloración de Gram.
	Sembrar en medios sólidos y líquidos para microorganismos aerobios: agar sangre, un medio lactosado para bacilos Gram negativos y medios para anaerobios.					
	Los medios sólidos y líquidos incubar en aerobiosis, con CO_2 o anaerobiosis según corresponda hasta 7 dias a 35ºC, realizando coloraciones de Gram, extrayendo una alícuota del fondo del tubo ante la presencia de turbidez y posterior subcultivos en medios sólidos para aislamiento. Realizar lecturas diarias para ambos tipos de medios.					

Descripción resumida de tres de los principales agentes causales de infecciones de piel y partes blandas y su identificación en el laboratorio

Staphylococcus aureus es por lejos el patógeno humano más importante entre los estafilococos por esta razón es que brindaremos una especial atención a su identificación de laboratorio y describiremos brevemente la realización de las pruebas mínimas necesarias para su identificación.



Se ha comentado previamente que se trata de un coco Gram positivo que se dispone en forma de racimo

El desarrollo habitual de *Staphylococcus aureus* lo logramos en Agar sangre ovina al 5% incubado a 35°C aeróbicamente o en Jarra con vela (CO_2 al 10%), también en medios comunes. En agar sangre habitualmente produce colonias blancas o doradas con un halo de β-hemolisis alrededor de las colonias.

Actualmente es posible la siembra primaria de las muestras en agar cromogenico como puede ser CHROMagar Staph aureus® (CHROMagar Microbiology, Paris Francia) y S aureus ID agar® (bioMerieux, La Balme Les Grottes, Francia) en el primero las colonias de *S. aureus* son de color malva y en el segundo las colonias son verdes, esto es gracias a la producción de α-glucosidasa durante su crecimiento.

agar sangre

CHROMagar *Staph aureus*®

S aureus ID agar®

Sabemos de la importancia que tiene el *Staphylococcus aureus* en estas patologías de piel y partes blandas, pero es muy importante diferenciarlo de otros estafilococos, como el *S.scheleiferi*, que se pueden encontrar en menor medida, y no por esta razón ser menos importantes. Como ya hemos descripto en secciones precedentes, ya sea en pacientes normoinmunes o en inmunosuprimidos estas bacterias cobran importancia siempre que las consideremos en el contexto del paciente.

Por tal motivo para poder identificar rápidamente algunos de los estafilococos que pueden estar involucrados presentamos el siguiente esquema

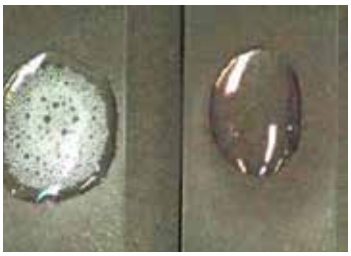
Pruebas bioquímicas de identificación de *S. aureus* y algunas especies de estafilococos coagulasa negativos(SCN).

	S. aureus	***S. epidermidis***	***S.scheleiferi***	***S.haemolyticus***	***S.lugdunensis***
Catalasa	+	+	+	+	+
Coagulasa en porta	+	-	+	-	+
Coagulasa en tubo	+	-	-	-	-
DNAsa	+	-	+	-	-
Fosfatasa alcalina	+	+	+	-	-
PYR	-	-	+	+	+
ODC	-	V	-	-	+
Ureasa	V	+	+	-	V
β-galactosidasa	-	-	+	-	-

-: Prueba negativa; + : prueba positiva; V : variable. Adaptado de S Molinos Abós et al. Infecciones por S.scheleiferi y otros ECN.

Catalasa: sobre un portaobjetos se coloca una colonia de coco Gram positivo y se le agrega encima una gota de H_2O_2 al 3 %. Cuidar de no arrastrar eritrocitos , pues tienen peroxidasa y puede arrojar resultado falso positivo.

Interpretación: Un burbujeo constante se interpreta como positivo.



Coagulasa: Es una importante prueba de identificación, tenemos dos tipos de coagulasa, la ligada o en portaobjeto ((“Factor de Clumping) y la libre en tubo.

Coagulasa ligada: colocar en un portaobjeto la colonia sospechosa y homogenizar con una pequeña cantidad de solución salina, inmediatamente agregar una gota de plasma de conejo anticoagulado con EDTA y mezclar lentamente con un ansa o palillo de madera.

Prueba positiva: se observa cómo se agruman los gérmenes.

Prueba negativa: los gérmenes permanecen distribuidos homogéneamente

Coagulasa libre en tubo: Agregar en un tubo de hemolisis, plasma de conejo anticoagulado con EDTA aprox. 1 a 1,5 ml, posteriormente homo-

geneizar en el mismo las colonias sospechosas e incubar a 35°C por 4 hs y observar, en caso que no se observe coagulo, dejar por un lapso de 18 hs (se aconseja hacerlo a Temp. ambiente por la posible fibrinólisis por incubación prolongada a 35°C) y hacer la lectura definitiva.

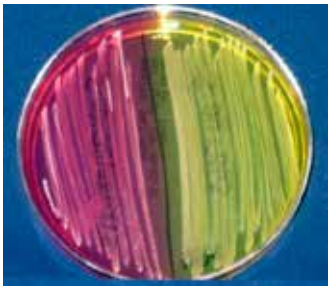
Prueba positiva: formación total o parcial de coagulo de fibrina.

Prueba negativa: no hay formación de coagulo.

Desarrollo y fermentación en agar manitol salado: se siembra una colonia sospechosa en medio agar manitol salado, preparado según indicaciones del fabricante, fraccionado en tubo pico de flauta o placa de Petri y se incuba aeróbicamente a 35°C durante 18-24 hs.

Prueba positiva: Crecimiento bacteriano con viraje de indicador al amarillo.

Prueba negativa: ausencia de desarrollo o desarrollo bacteriano permaneciendo el medio de color rojo.



Actividad desoxirribonucleasa: utilizar agar desoxirribonucleasa para la detección de la enzima desoxirribonucleasa, preparado como indica el fabricante y fraccionar en placas de Petri.

Sembrar un inóculo denso, ya sea en estría o por la técnica de spot e incubar 24-48 hs a 35°C aeróbicamente.

Cubrir la placa con ácido clorhídrico 1N, y observar dentro de los primeros 5 minutos.

Prueba positiva: halo claro, transparente alrededor del crecimiento bacteriano.

Prueba negativa: el medio se observa opaco

Prueba de PYR: se utiliza la misma técnica que se describe más adelante para *S. pyogenes,* pero debemos tener presente que cuando se utiliza para diferenciar *Staphylococcus* spp., la incubación se debe realizar, según algunos investigadores, durante 2 horas a 35ºC, en aerobiosis.

Ornitina descarboxilasa (ODC): se utiliza el medio caldo descarboxilasa según Moeller Sembrar un tubo de hemolisis con el medio base sin ornitina (control) y un tubo que contenga el aminoácido , cubrir con vaselina estéril e incubar a 35°C 18-24 hs.

Prueba positiva: tubo control color amarillo y el tubo con ornitina color violeta.

Prueba negativa; ambos tubos de color amarillo

(-) (+)

Prueba de urea: para identificar microorganismos que hidrolizan la urea mediante la enzima ureasa, se utiliza el medio urea de Christensen preparado según indicaciones del fabricante.

Sembrar la cepa sospechosa por punción y estría. Incubar a 35°C 18-24 hs..aeróbicamente.

Prueba negativa: el tubo se observa de color amarillo

Prueba positiva: el tubo se observa color rosado-rojizo

(-) (+)

Fosfatasa alcalina: No existe un unico metodo comercial y es de complejidad variable, los autores Geary y Stevens informaron un metodo simple utilizando agar Mueller–Hinton con buffer a pH 5,6-5,8 (agar PNP) que contiene 0,495 mg/ml de *p-nitrofenil fosfato* (PNP*)*. El microorganismo se cultiva por el metodo de punto o "spot" y se incuba 18-24 hs a 35°C.. Una coloracion amarillo brillante debajo y alrededor del inoculo se interpreta como una prueba positiva

La prueba de hidrolisis del PNP tambien se puede realizar en tubo siguiendo la metodologia de Penny y Huddy : preparar un tubo con 0,5 ml de

PNP al 0,1%, mezclar un inoculo denso de la cepa sospechosa proveniente de agar sangre , leer a las 4hs , el viraje del sustrato a color amarillo, por liberacion de p-nitrofenol, se interpreta como reaccion positiva.

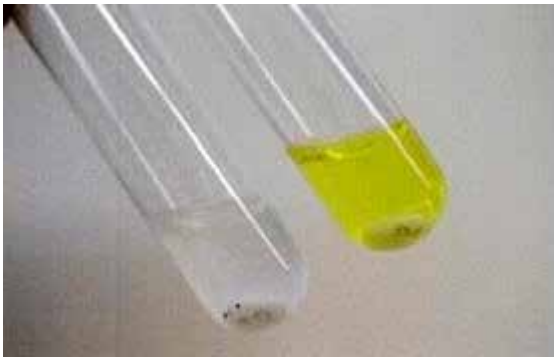
Tambien existen discos y tabletas comerciales para demostrar la accion de la enzima

β-Galactosidasa: Se utiliza esta prueba para demostrar la acción de la enzima sobre un sustrato cromogenico orto-nitrofenil β-D galactopiranosido (ONPG) produciendo un viraje del sustrato incoloro al amarillo por formacion de orto-nitrofenol.

A partir de un cultivo puro, hacer una suspensión densa en 0.2 ml de solución fisiológica estéril (aproximadamente Nº 2 de la escala de Mc Farland), y agregar un disco de O.N.P.G. Incubación en aerobiosis, a 35-37 ºC hasta 4 horas antes de leer el resultado (incubar hasta 24 horas antes de descartar una reacción como negativa).

Prueba negativa: el tubo se observa incoloro.

Prueba positiva: el tubo se observa color amarillo.

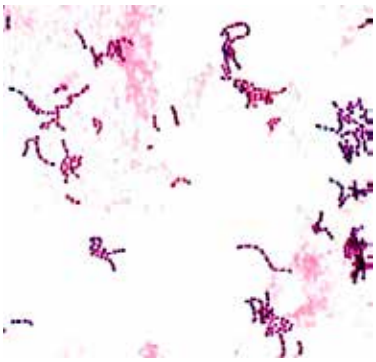


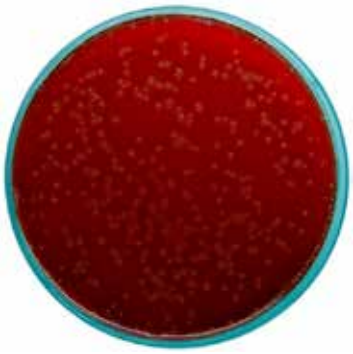
Streptococcus pyogenes

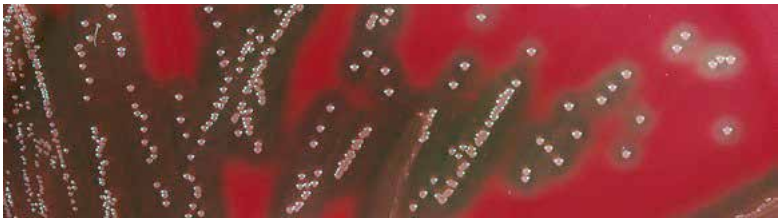
Como vimos en este y otros capitulos, dentro de los germenes frecuentemente involucrado en las diferentes patologias de piel y partes blandas tenemos al *Streptococcus pyogenes*.

Precedentemente habiamos dicho que esta bacteria es un coco Gram positivo aerobio- anaerobio facultativo que se dispone en forma de diplos y cadenas.

El desarrollo de *Streptococcus pyogenes* habitualmente se logra en agar sangre ovina al 5% incubado a 35°C aeróbicamente o en Jarra con vela (CO_2 al 10%), las colonias en este medio son pequeñas blancas brillantes con un marcado halo de β-hemolisis alrededor.Se obtiene además excelente desarrollo en agar chocolate y en numerosos caldos de enriquecimiento.



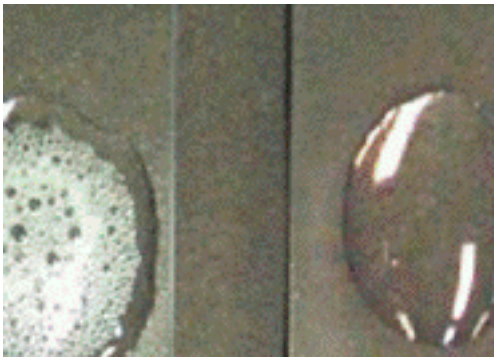




Catalasa: sobre un portaobjetos se coloca una colonia de coco Gram positivo y se le agrega encima una gota de H_2O_2 al 3 %. Cuidar de no arrastrar eritrocitos si se toma la colonia del agar sangre, porque estos tienen peroxidasa y puede arrojar resultado falso positivo.

Prueba positiva: Un burbujeo constante.

Prueba negativa: Ausencia de burbujeo.



Prueba de PYR: Esta prueba detecta la capacidad de ciertas bacterias de sintetizar la enzima l-pirrolidonilarilamidasa (PYRasa).

A partir de un cultivo puro en agar sangre, previo conocer que se trata de cocos Gram positivos catalasa negativa.

Hacer una suspensión densa en 50 µl de solución fisiológica estéril, y agregar un disco impregnado con el sustrato pirrolidonil-β-naftilamida.

Incubar en aerobiosis, a 35ºC, 30 minutos.

Agregar dos gotas de reactivo cinamaldehído y dejar a temperatura ambiente hasta 5 minutos.

Prueba positiva: disco color rosado a rojo.

Prueba negativa: disco y/o solución color amarillo o incoloro.

Prueba de Bacitracina: - Realizar una suspensión del microorganismo en estudio (de turbidez igual a la del estandard 0.5 de la escala de Mac Farland).

Mediante la técnica de hisopado en superficie, inocular el microorganismo en estudio en una placa de Agar Sangre ( ).

Colocar un disco de Bacitracina de 0,04 U sobre la superficie del agar.

Incubar en atmósfera 10% de CO2 (jarra con vela), a 35ºC durante 24 horas.

Prueba positiva: presencia de halo de inhibición del desarrollo microbiano alrededor del disco de Bacitracina (independientemente del diámetro).

Prueba negativa: ausencia de halo de inhibición del desarrollo alrededor del disco.

Medios de cultivo primarios para aislamiento de bacterias anaerobias

> Agar sangre CDC

Agar tripteina soja	15	g
Fitona	5	g
Cloruro de sodio	5	g
Agar	20	g
Extracto de levadura	5	g
Hemina (1mg/ml)	1	ml
Vitamina K_1(3-fitomenadiona)(10mg/ml)	1	ml
L-cistina	400	mg
Agua destilada	1000	ml

Suspender los ingredientes en agua destilada, disolver por calentamiento en baño maría. a ebullición.

Autoclavar 15 min a 121°C

Enfriar a 50°C y agregar sangre de carnero, oveja o conejo desfibrinada al 5%

Mezclar y distribuir en placas de Petri.

Se puede reemplazar el agar tripteina soja por otros: Agar base: Brucella; Infusion cerebro-corazon; Schaedler y Columbia (respetar las cantidades que indica el fabricante).

> Agar sangre Feniletil alcohol

Este medio se prepara de manera similar al Agar sangre CDC pero suplementado con 2,5 g/l de Feniletil alcohol.

> Agar sangre kanamicina-vancomicina / paromomicina-vancomicina

Estos medios se preparan de manera similar al Agar sangre CDC pero suplementados con:

100 ug de kanamicina /paromomicina y 7,5 ug de vancomicina por mililitro de medio de cultivo

Observación: Los medios de cultivo descriptos anteriormente pueden ser preparados con sangre lacada: Sometiendo la sangre a congelación a -20°C y posterior descongelación a 37°C, repetir el proceso hasta que la sangre quede brillante y translucida. Utilizar en igual proporción que la sangre entera.

> Caldo Tioglicolato enriquecido (THIO)

Medio Caldo tioglicolato sin indicador cantidad indicada por el fabricante, agregar hemina y vitamina K_1(3-fitomenadiona) en concentraciones similares a las utilizadas en el Agar sangre CDC.

> Pruebas utilizadas en el laboratorio para identificación presuntiva de *Clostridium perfringens*

Esta es una de las bacterias anaerobias más comúnmente aislada de tejidos necróticos en partes blandas, veremos tres de las pruebas de identificación presuntiva más comunes:

> A) observacion de doble zona de hemolisis en sangre ovina

Sembrar en agar sangre CDC ovina , incubar en anaerobiosis 18-24 hs.

Observar en agar sangre una hemolisis total (β) alrededor de la colonia y una hemolisis más tenue alejada de la colonia.

> B) producción de lecitinasa en agar yema de huevo

Para la realización de esta prueba se debe preparar el medio base que se describe a continuación:

Agar yema de huevo		
Peptona ó tripteina	20	g
Na2HPO4	2,5	g
NaCl	1	g
MgSO4 (5% p/v de sulfato de magnesio)	0,1	ml
Glucosa	1	g
Agar	12,5	g

Agua destilada 500 ml

Mezclar los ingredientes y calentar con agitación hasta disolución total.

Ajustar el pH a 7,3 - 7,4 y esterilizar en autoclave 30 min a ½ atm.

Enfriar en baño de agua a 50°C.

Añadir asépticamente, la yema de huevo al medio de cultivo a razón de 5ml cada 100 ml de medio fundido y enfriado, mezclar hasta obtener una suspensión homogénea.

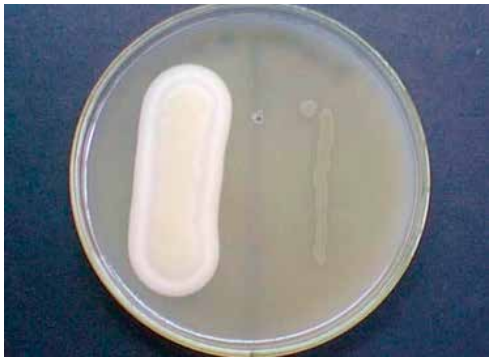
Fraccionar el medio en placas de Petri.

> Preparación de la yema de huevo

Lavar bien los huevos dejar secar y desinfectar la cáscara con alcohol etílico 70°alrededor de 3 hs.. Dejar secar, romper la cáscara y separar asépticamente la yema.

Realizar una estría en una placa de agar yema de huevo con el microorganismo a identificar. Incube durante 48-72 hs en anaerobiosis a 35°C.

Lecitinasa positiva: aparición de una zona opaca alrededor del crecimiento microbiano, como resultado de la hidrólisis de la lecitina de la yema de huevo.

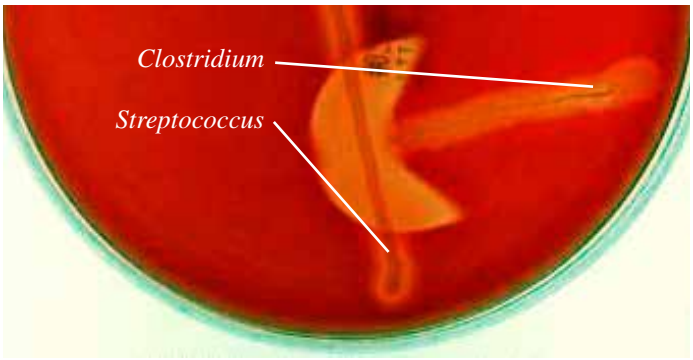


Positivo Negativo

> C) prueba de camp reversa

Se realiza en agar sangre anaerobio ovina o carnero. Estriar la cepa incognita y a 90° se cruza una estria de *Streptococcus agalactiae.*

Incubar 24 hs en anaerobiosis y observar la hemolisis sinergica con forma de flecha con la punta que va desde el *Streptococcus agalactiae* hacia la cepa de *Clostridium perfringens* (cepa incógnita).



Mordeduras animales y humanas

Éstas consisten en laceraciones, rasguños, avulsiones o heridas punzantes. Las complicaciones infecciosas son habitualmente producidas por bacterias que forman parte de la biota oral del animal mordedor, y sólo en algunos casos causadas por los microorganismos del medio ambiente o de la piel del individuo que sufrió la mordedura.

La mayoría de las mordeduras son producidas por perros y gatos, pero no debemos olvidar las mordeduras humanas.

Las mordeduras de perro se infectan en 3 a 18% de los casos, aquellas producidas por gatos 28 a 86% y las humanas tienen riesgo intermedio.

Generalmente son polimicrobianas, con presencia de microbiota aeróbica y anaeróbica, siempre relacionadas con los microorganismos que habitan en la boca del agente mordedor ya sea animal o humano, más que de la piel del individuo afectado.

Los anaerobios son aislados en 2/3 de los casos, especialmente cuando se ha producido un absceso.

Microorganismos relevantes

Mordeduras humanas
Streptococcus pyogenes
Fusobacterium spp.
Haemophilus parainfluenzae
Eikenella corrodens
Staphylococcus aureus
Prevotella spp.
Bacteroides spp.
Porphyromonas spp.

Mordeduras producidas por perros y gatos
Pasteurella multocida
Staphylococcus aureus
Pasteurella septica
Bacteroides spp.
Pasteurella canis
Fusobacterium spp.
Capnocytophaga caninomorsus
Prevotella spp.
Streptococcus pyogenes
Erysipelothrix rhusiopathiae
Porphyromonas spp.

Pasteurella spp. se aíslan en 50% de las mordeduras de perros y 75% en las de gato.

Eikenella corrodens se aísla en 15 a 30% de las infecciones secundarias a mordeduras de humanos.

Los animales acuáticos en algunos casos pueden generar infecciones por microorganismos propios del medio tales como *Vibrio* spp. y *Aeromonas* spp.

La toma de cultivos de heridas clínicamente no infectadas generalmente no ayuda al manejo de las mismas y por esa razón no se recomienda esta práctica

Si la herida muestra signos sugestivos de infección se sugiere la toma de cultivos de la porción más profunda de la lesión por punción enviando la muestra para cultivo de microorganismos aerobios y siempre que exista disponibilidad - anaerobios.

Si la herida se ha contaminado con material del suelo o restos vegetales puede ser útil cultivar para hongos y micobacterias.

Artritis infecciosa

Los agentes etiológicos (bacterianos son los principales) varían con la edad de los pacientes.

Staphylococcus aureus es el agente etiológico principal de la artritis séptica del adulto, como *H. influenzae* es el agente predominante en niños y *N. gonorrhoeae* en adultos jóvenes.

En general en un 10-20% de las artritis bacterianas diagnosticadas clínicamente no se aisla el agente etiológico.

> Toma de muestra

Líquido articular obtenido por aspiración en tubo estéril sin anticoagulante y con los recaudos ya mencionados en el transporte para muestras con probable participación de anaerobios y aerobios (aguja obturada y a temperatura ambiente).

> Procesamiento de laboratorio

Centrifugar una porción del líquido y con el sedimento proceder a examen en fresco (observar hematíes, respuesta inflamatoria y eventualmente cristales), coloraciones de Gram y Ziehl-Neelsen, y Giemsa.

Es conveniente conservar una porción de la muestra por si es necesario resembrar el material original.

La coloración de Gram tiene baja sensibilidad, pudiendo no observarse la presencia de microorganismos.

La sensibilidad de la coloración de Gram es diferente según se trate de artritis gonocócica y no gonocócica.

Evaluar la respuesta inflamatoria es de suma importancia.

	Análisis fluido articular		
	Normal	**Inflamación**	**Infección bacteriana**
Color	Incoloro amarillo pálido	Amarillo	amarillo a verde
Aspecto	transparente	Opaco /turbio	opaco /purulento
Leucocitos /mm3	<200	5000-75000	>100000
Polimorfonucleares (PMN)	<25%	>50%	>75%
Glucosa	» glucosa sanguínea	< que glucosa sanguínea	< que glucosa sanguínea
Gram	negativo	Negativo	positivo (50-75%)*
Cultivo	negativo	Negativo	frecuentemente positivo*

*Excepto en artritis gonocócica donde el Gram y el cultivo son positivos en menos del 50% de los casos.

Artritis séptica: examen líquido sinovial

Toma de muestra	Líquido articular obtenido por aspiración en tubo estéril sin anticoagulante
	En la coloración de Gram, tener en cuenta los falsos positivos por mucina precipitada. Es conveniente centrifugar el líquido previamente ya que mejora el rendimiento. El recuento de leucocitos generalmente es elevado con >90% de predominio de PMN, valores que también se pueden presentar en otras patologías: artritis cristálica, artritis reumatoidea, síndrome de Reiter, entre otras.
Procesamiento	Sembrar inmediatamente. Las siembras están dirigidas a la búsqueda de los patógenos involucrados: agar sangre, agar chocolate, agar lactosado, caldo tioglicolato, con y sin CO2, agregando Thayer-Martin ante la sospecha de artritis gonocócica y medios de cultivo anaeróbico. Incubar a 35°C al menos 72 horas. En todos los casos donde se usen medios líquidos (tioglicolato) incubar al menos 7 días, pues los cultivos primarios en placa frecuentemente son negativos. Acompañar de hemocultivos.
Consideraciones	El rendimiento de la coloración de Gram es, aproximadamente, del 50-75% para cocos grampositivos, 50% para bacilos gramnegativos y menor al 25% para gonococos.
	En artritis séptica no gonocócica más del 90% de los cultivos son positivos. Dicho porcentaje disminuye al 25-30% en artritis gonocócica.
	Los microorganismos recuperados solo en los medios líquidos deben ser interpretados con PRECAUCION. Si se recuperan microorganismos que forman parte de la microbiota habitual de piel y mucosas ó que pueden ser considerados oportunistas, , se debe dialogar con el médico para conocer detalles de la toma de muestra y de la patología del paciente.
	La detección de antígenos por aglutinación con partículos de látex o contrainmunoelectroforesis no es muy útil, salvo para la búsqueda de *H. influenzae* y *S. pneumoniae*.

Recordar que el diagnóstico definitivo de artritis tuberculosa se realiza identificando los bacilos ácido alcohol resistentes (b.a.a.r.) por coloración de Ziehl-Neelsen en biopsia de tejido sinovial o aislando *M. tuberculosis* en cultivo del tejido sinovial o del fluido articular, siendo estos positivos en más del 80% de los casos.

Recordar que para el diagnóstico de Enfermedad de Lyme, producida por *Borrelia burgdorferi*, el diagnóstico se realiza por aislamiento de las espiroquetas a partir de hemocultivos o demostrando su presencia en biopsia de piel y membrana sinovial a través de coloraciones histológicas.

Bibliografía consultada

A L. Egea, P Gagetti, R Lamberghin, D Faccone, C Lucero, A Vindel, D Tosoroni, A Garnero, H A. Saka, M Galas. S. aureus Study Group-Argentina1, José L. Boccoa, Alejandra Corsob, Claudia Solaa. New patterns of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) clones, community-associated MRSA genotypes behave like healthcare-associated MRSA genotypes within hospitals, Argentina International Journal of Medical Microbiology 304 (2014) 1086–1099

Baron S (Ed). : *Medical Microbiology*. 4th Ed. The University of Texas Medical Branch (UTMB). http://gsbs.utmb.edu

Bayley & Scott: *Diagnóstico Microbiológico*. Forbes Betty, Sahm Daniel F, Weissfeld Alice S - (2009) 12°Edicion. Ed. Médica Panamericana.

Begier E M, Frenette K, Barrett N L, Mshar P, Petit S, Boxrud D J, Watkins-Colwell K, Wheeler S, Cebelinski E A, Glennen A, Nguyen D, Hadler J L; Connecticut Bioterrorism Field Epidemiology Response Team. A high-morbidity outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among players on a college football team, facilitated by cosmetic body shaving and turf burns Clin Infect Dis 39(10): 1446-1453. 2004.

Benassi F, Vergara M, Von Specht M, García M, Quiroga M, Pucciarelli A, Zubreski E, Laczeski M, Martin B, Leardini N, Gutkind G. Estudio de susceptibilidad a antibióticos ßlactámicos en *Aeromonas spp.* de origen clínico, animal y ambiental. *Rev Argent Microbiol*. 33(1): 47-51. 2001.

Benítez C. "Piomiositis Tropical". *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste*. XXI(2): 28-31. 2003.

Bernard P. Management of common bacterial infections of the skin. Curr Opin Infect Dis. 21(2): 122-128. 2008.

Burillo A, Moreno A, Salas C . Diagnóstico microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos (2006). http://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia22. pdf

Buzzola F R, Alvarez L P, Tuchscherr L P, Barbagelata M S, Lattar S M, Calvinho L, Sordelli D O. Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse *agr* groups to invade mammary epithelial cells. *Infect Immun* 75(2): 886-891. 2007.

Candí C J, Schreiber J R. Terapias y vacunas para infecciones bacterianas emergentes. Aprendiendo del *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. http://www. prematuros.cl/weboctubre06/Estafilococo/estafilococo.htm

Chavez Fernando. Infecciones por variantes de colonia pequeña de *Staphylococcus aureus*: implicaciones clínicas y microbiológicas Enferm. Infecc. Microbiol Cli. 2013.

Clinical Infectious Diseases Advance Access. Published June 18, 2014.

Consenso SADI-SAM-SAD-CACCVE- Guía para el manejo racional de las infecciones de piel y partes blandas – Anexo. *Rev Panam Infectol* 2010; 12(2): 61-67.

Consenso SADI-SAM-SAD-CACCVE. Guía para el manejo racional de las infecciones de piel y partes blandas – Parte I. *Rev Panam Infectol* 2009; 11(3): 49-65.

Consenso SADI-SAM-SAD-CACCVE. Guía para el manejo racional de las infecciones de piel y partes blandas – Parte II. *Rev Panam Infectol* 2009; 11(3): 47-62.

Consenso SADI-SAM-SAD-CACCVE. Guía para el manejo racional de las infecciones de piel y partes blandas – Parte III. *Rev Panam Infectol* 2010; 12(1): 60-74

Domínguez Luzón M A, Rojo M. Cambios en la Epidemiología de *Staphylococcus aureus* Resistentes a la meticilina. Recomendaciones para el control de su diseminación. Control Calidad SEIMC. http://www.seimc. org/control/revi_Bacte/Marsactrl.htm

Gabillot-Carré M, Roujeau J C. Acute bacterial skin infections and cellulitis. *Curr Opin Infect Dis* 20(2): 118-123. 2007.

Gagetti Paula, Corso Alejandra. Actualización en *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina de la comunidad. Asociación Argentina de Microbiología. Julio-septiembre 2011.

Gardella N, von Specht M, Cuirolo A, Rosato A, Gutkind G, Mollerach M.

Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus, eastern Argentina. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008 Nov; 62(3): 343-7.

Guidelines for the Diagnosis and Management of Skin and Soft Tissue Infections: 2014

Infecciones de piel y partes blandas en pediatría: consenso sobre diagnóstico y tratamiento-Parte 1. Sociedad Argentina de Pediatría Subcomisiones, Comités y Grupos de Trabajo. Arch Argent Pediatr 2014; 112(1): e96-e102.

Infecciones de piel y partes blandas en pediatría: consenso sobre diagnóstico y tratamiento-Parte 2. Sociedad Argentina de Pediatría Subcomisiones, Comités y Grupos de Trabajo Arch Argent Pediatr 2014; 112(2): 183-191.

Notario R, Lejona S, Mendez A L, Lascialandare S, Borda N. Aislamiento de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes adquiridos en la comunidad (SAMR_AC), en Rosario y Santa Fe. *Rev Med Rosario* 73: 82-85. 2007.

Paula Gagetti, Alejandra Corso actualizacion en *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina de la comunidad. Area Científica y Técnica. AAM. Julio-sep 2011.

Plos one: www.plosone.org November 2013/volume 8/Issue 11/ e78303Practice

Quiroga M, Pegels E, Villalba V, Stefañuk R, Vergara M. *Aeromonas* spp. involucradas en infecciones de piel, partes blandas y hueso. XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología- X Congreso Argentino de Microbiología. A101 (en CD), Buenos Aires, Argentina. 2004.

S Molinos Abós et al. "Infecciones por S. scheleiferi y otros ECN"

https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/ Sschleiferi.pdf-

Stevens D L, Bisno A L, Chambers H F, Everett E D, Dellinger P, Goldstein E J, Gorbach S L, Hirschmann J V, Kaplan E L, Montoya J G, Wade J C. Infectious Diseases Society of America. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft-tissue infections. *Clin Infect Dis* 41(10): 1373-1406. 2005.

Tart A H, Walker M J, Musser JM. New understanding of the group A *Streptococcus* pathogenesis cycle. *Trends Microbiol* 15(7): 318-325. 2007.

Vergara M, Rinaldi M, Quiroga M. *Streptococcus* ß-hemolítico grupo A y grupo B aislados en infecciones graves de pacientes adultos. XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología- X Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires, Argentina. 2004.

Vergara Marta, Quiroga Marina, Oviedo Patricia, Pegels Eduardo. *Las Infecciones bacterianas y el laboratorio de bacteriología*. 1ra. Edición. Posadas. EdUNaM. 2009.

von Spech, Marta: *Staphylococcus aureus resistente a meticilina de la comunidad. Primer alerta desde Misiones*. EdUNaM. 2012.

von Specht MH, Gardella N, Ubeda C, Grenon S, Gutkind G, Mollerach M. Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus skin and soft tissue infections in a pediatric hospital in Argentina*. J Infect Dev Ctries*. 2014 Sep 12; 8(9): 1119-28. doi:10.3855/jidc.4271.

W. E. Morris*, M. E. Fernández-Miyakawa. Toxinas de Clostridium perfringens. Instituto de Patobiología, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Revista Argentina de Microbiología (2009) 41: 251-260.

CAPÍTULO 6
Infecciones del Sistema Nervioso Central (SNC)- meningitis

Las bacterias y la virulencia ■ marta vergara

El sistema nervioso central (SNC) es particularmente vulnerable al mínimo daño que ocurra en sus estructuras.

El pasaje del impulso nervioso requiere de un normal funcionamiento de las membranas de las células neuronales.

Un edema de determinado tamaño en tejidos o células en otros sitios puede ser tolerado, no así en el cerebro donde puede tener catastróficas consecuencias, como así también el daño celular de los endotelios que lo envuelven.

El camino al Daño

El SNC es relativamente inaccesible a la invasión bacteriana de patógenos provenientes de la sangre, por la protección que le confiere la barrera hematoencefálica, y por una cobertura externa como leptomeninges y cráneo.

El acceso de un patógeno al SNC, ocurre ante un defecto previo en la barrera externa como una mastoiditis purulenta, un post traumatismo o una post cirugía, o ante una disminución de las defensas del huésped.

Cuando las bacterias alcanzan una elevada concentración, penetran hasta las membranas piamadre y aracnoides, ocasionando meningitis.

Cuando nos referimos a meningitis, nos referimos a la inflamación de las meninges o cordón espinal.

El daño celular tiene profundos efectos si las células endoteliales de los pequeños vasos están involucradas.

Los cambios en la circulación pueden conducir a la anoxia o necrosis tisular de los vasos. De hecho que, el sitio de lesiones vasculares será tan crítico y en especial en órganos como cerebro y corazón, que impactará en todo el huésped.

Todos los patógenos, agentes etiológicos de la meningitis bacteriana, parecen expresar un rango de proteínas de superficie que facilitan la interacción entre patógeno y huésped y cuyas funciones se estudian.

De las interacciones entre un patógeno y el huésped se puede llegar a la **adherencia, colonización, invasión,** sobrevida en la sangre (**bacteriemia**) y **siembra de las meninges** con la consiguiente inflamación meníngea promovida por la llegada de componentes plasmáticos como leucocitos, proteínas y otros.

Un prerrequisito para el desarrollo de la meningitis bacteriana es la **adherencia** y **colonización** de la nasofaringe por el patógeno las que logra venciendo las defensas del huésped (IgA secretora y actividad ciliar), con las IgA proteasas y dañando su epitelio ciliar mediante adhesinas pilis y no pilis. Una infección viral respiratoria previa que daña el epitelio ciliado nasofaríngeo facilita la penetración de la bacteria colonizante. Microorganismos residentes, como neumococo, meningococo y los haemophilus, **invaden** y se diseminan.

Las bacterias ingresan al torrente sanguíneo por los focos contiguos de infección o por la implantación de sistemas de derivación del líquido cefalorraquideo (LCR).

El patógeno logra la supervivencia intravascular mediante la evasión de la vía alternativa del complemento, defensa ésta que ofrece el huésped, con lo que se facilita la penetración en el espacio subaracnoideo. La presencia de la cápsula bacteriana, al inhibir eficazmente la fagocitosis por neutrófilos y resistir la actividad bactericida clásica mediada por el complemento, puede aumentar la supervivencia del microorganismo en el torrente sanguíneo, lo que facilita la replicación intravascular.

Los patógenos bacterianos más comunes, *H. influenzae, N. meningitis, S. pneumoniae, E. coli, S. agalactiae*, son capsulados.

Bacterias como *E. coli,* que posee el antígeno capsular K1, son de manera desproporcionada asociados a la meningitis neonatal en ausencia de anticuerpos anti K1, pues son fuertemente resistentes a la fagocitosis.

El patógeno ahora debe atravesar la barrera hematoencefálica y lo logra mediante pilis adhesivos que le posibilitan vencer la defensa del huésped, el endotelio cerebral. El mecanismo por el cual las bacterias atraviesan la barrera hematoencefálica no está, aún, del todo clarificado.

Se postula que por endocitosis o cruzando entre las células o bien protegidas por los glóbulos blancos, la penetración de las bacterias puede ser factible. Desde la sangre las bacterias ingresan en el LCR a través de los plexos coroideos por el daño local que provocan en los capilares de los plexos. El patógeno ahora se encuentra en el L.C.R. donde su estrategia es sobrevivir en él multiplicándose.

El LCR se llena de un exudado inflamatorio y ello, y su escasa actividad opsónica, contribuyen a transformarse en un excelente medio para la multiplicación del microorganismo. Además, los mecanismos de defensa en el LCR no funcionan con la rapidez que lo hacen en otro sitio del huésped.

Desde allí se diseminan a las leptomeninges invadiendo las venas corticales cerebrales.

Las consecuencias son de severidad, por reducción del flujo sanguíneo, anoxia y necrosis en los tejidos, disminuyendo la glucosa y aumentando el contenido de ácido láctico en el LCR.

Se produce disfunción cortical cerebral como consecuencia de la alteración y flujo del LCR, inflamación de las meninges que llegan a formar trombos en las venas cerebrales, lo que aumenta la disminución del flujo, llegando a la obstrucción, que conduce a un aumento de la presión intracraneal.

Muchos de los constituyentes de la pared del neumococo, como ácido teicoico y la endotoxina de los gramnegativos, son activadores de la inflamación meníngea, probablemente mediante diversos mediadores que se gatillan como el FNT, el C5a, IL-1, IL-6 y otros péptidos inflamatorios activos **(Capítulo 1)**.

Frecuentemente se presenta hipertensión intracraneana secundaria a edema cerebral vasogénico, citotóxico o intersticial, como hidrocefalia por bloqueo del flujo de LCR por el exudado inflamatorio presente.

Si todos estos procesos no son detenidos o modulados a tiempo pueden terminar en severas secuelas o hasta con la vida del paciente.

Los caminos hacia la meningitis bacteriana aguda son similares en las causadas por*, H. influenzae, S. pneumoniae, N. meningitidis.*

Las bacterias

> *Haemophilus influenzae*

En el hombre esta bacteria fue aislada por Pfeiffer en 1892, quien la caracterizó como agente etiológico de la fiebre epidémica o influenza, hasta que se demostró que esa enfermedad era causada por virus.

Conjuntivitis aguda, faringitis, sinusitis, neumonías y meningitis, especialmente en niños son las principales enfermedades que tienen a *H. influenzae* como agente etiológico.

Es un bacilo gramnegativo, muy pequeño, que se presenta en pares o en cadenas. Unas cepas aparecen capsuladas. Es una bacteria inmóvil, no forma esporas y su coloración es a veces bipolar.

El cultivo en atmósfera de CO_2 es recomendable para un buen desarrollo inicial. Son aeróbicos y anaeróbicos facultativos.

Su nombre significa "que aman la sangre" derivado de su necesidad de los componentes X y V de la sangre para su desarrollo, llamados factores X y V.

El factor V, una coenzima que se encuentra en los eritrocitos, debe ser liberado en el medio de cultivo, alterando los eritrocitos por el calor, no excesivo, ya que el exceso de calor destruye el factor V (el medio de agar chocolate es un excelente medio) o bien debe ser provisto por cepas de *Staphylococcus aureus* hemolítico, lo que promueve un crecimiento de *H. influenzae* en satelitismo alrededor de una estría del estafilococo.

La adición de estos factores al medio de cultivo artificial, posibilita una buena recuperación del microorganismo. Esto se logra con el agar chocolate, o agar sangre con la ayuda de la cepa de *Staphylococcus aureus.*

Se debe ser cuidadoso con los cultivos, pues tienden a autolisarse, por lo que para mantenerlos viables, se debe recurrir a frecuentes repiques.

La bacteria no se encuentra en estado libre en la naturaleza, y está totalmente adaptada al ser humano. Es muy sensible a la luz solar, al frío, y a la desecación.

El reservorio es el hombre y se localiza en la faringe y prácticamente está ausente en la cavidad bucal.

Siempre fue considerado un patógeno extracelular.

No obstante existen actualmente evidencias que sugieren una vida extracelular y una intracelular. Se lo puede encontrar en la luz de las vías respiratorias, unido a la mucina, adherido a las células y también en el intersticio de la submucosa y en el interior de las células de las vías respiratorias.

Mucho de la colonización y la respuesta inmune, tan específica, se explicarían por estos supuestos.

La portación faríngea es importante en la transmisión de esta bacteria.

La fuente de infección es el hombre.

Las infecciones por este microorganismo ocurren en todo el mundo, en especial en zonas de bajos recursos económicos.

Entre los portadores 70% son niños pequeños y 30% adultos. Con excepción de los recién nacidos, se recupera de la nasofaríngе de casi todos los niños. Hacia los 3 meses de vida los niños albergan el microorganismo en su tracto respiratorio alto. En la población microbiana normal se encuentra mayoritariamente en forma no capsulada, pero entre un 3 a 7% de individuos sanos portan intermitentemente cepas capsuladas en el tracto respiratorio superior.

Desde su nacimiento el hombre está expuesto a adquirir las cepas no tipables (no capsuladas). Estas cepas comensales habituales que albergan casi todos los niños (70%), son diferentes de las cepas invasoras, capsuladas.

La cápsula produce anticuerpos contra la infección y confiere especificidad de tipo, lo que permite clasificarlos en serotipos que se designan a, b, c, d, e, y f.

La cápsula tipo b los hace más invasivos. Las cepas que no poseen cápsula no lo son.

La cápsula tipo b, es un polisacárido de polirribosil-ribitol-fosfato-(PRP-)

Si bien se pensó que podría tratarse de la misma cepa que adquiriría la cápsula para poder invadir, ya sea adquiriendo los genes necesarios para dicha producción ¿o se trataría de dos cepas diferentes, las capsuladas y las no capsuladas? - estudios realizados por biología molecular parecen aportar datos, por distancia genética, movilidad electroforética de ciertas enzimas, entre otras, que se trataría de dos diferentes cepas.

H. influenzae no produce exotoxinas demostrables.

Aunque en la bacteriemia y la meningitis, la virulencia está asociada directamente a la cápsula, las bases de la virulencia de esta bacteria son complejas e involucran a determinantes genéticos capsulares y no capsulares.

Diversos factores de virulencia han sido identificados en las cepas capsuladas y no capsuladas, como los pilis que median en la hemoaglutinación y en la adherencia.

La bacteria posee tres factores antigénicos importantes en sus envolturas:

El LPS: llamado LOS (lipooligosacárido), semejante al LPS de las enterobacterias, consiste sólo en lípido A y una estructura equivalente al core del LPS. El componente antigénico principal es la fracción polisacárida no tóxica.

El LOS cumple funciones en la adherencia de la bacteria a las células del epitelio respiratorio al ejercer una acción paralizante de las cilias del epitelio ciliado promoviendo la multiplicación del microorganismo en el árbol bronquial. Cuando se libera junto a fragmentos de peptidoglucano y otros antígenos, induce la inflamación en el huésped.

Proteínas de membrana externa:

Todas las cepas virulentas producen neuraminidasa y una IgA proteasa, que al clivar a la IgA (presente en la orofaringe como defensa local) facilita la adherencia a las superficies mucosas. La proteasa, a modo semejante de lo que ocurre en gonococo y ciertos estreptococos, inhibe la fagocitosis al unirse a la fracción Fc de la IgA.

La bacteriocina llamada "haemocin" es una proteína que inhibe el desarrollo de organismos de la misma especie o relacionados. Esta bacteriocina que no la producen las cepas no capsuladas, contribuiría a la habilidad de *H. influenzae* b para competir con dichas cepas, en la colonización de la nasofaringe.

El polisacárido capsular:

En la enfermedad invasiva, la cápsula es el más importante factor de virulencia dado que transforma a esta bacteria en resistente a la fagocitosis por polimorfonucleares en ausencia de anticuerpo anticapsular.

También la cápsula reduce la susceptibilidad al poder bactericida del suero, la que depende además de anticuerpos contra otros sitios antigénicos como el LOS y proteínas de membrana externa llamadas P1 y P2.

La cápsula permite a la bacteria invadir y sobrevivir en la sangre.

La posibilidad de sobrevivir en la sangre depende en gran medida del título de anticuerpos circulantes.

Los anticuerpos anticapsulares son fuertes opsoninas y permiten que los microorganismos sean captados y destruidos por el sistema fagocítico mononuclear.

H. influenzae no capsulado se deposita en el epitelio de las vías aéreas altas, y debe iniciar el primer paso para desarrollar la enfermedad, que es la adherencia, la que se facilita por la presencia de adhesinas de superficie, pilis, que lo llevan a adherirse a la mucina.

Adherido ya a las células respiratorias, tanto en el intersticio de la submucosa y en el interior de las células de las vías respiratorias, evita la depuración mucociliar y otros mecanismos de defensa del huésped.

Estas cepas se adhieren a la mucosa de la boca mientras la mayoría de las capsuladas no lo hacen.

Puede colonizar las vías respiratorias bajas, en algunas circunstancias como en las exacerbaciones agudas de origen infeccioso, EPOC y la F.Q.

En el tracto respiratorio, dañado previamente por otros factores, además por *H. influenzae* no capsulado que paraliza el movimiento ciliar se favorece la colonización y posterior acción lesiva conduciendo a infecciones del oído (otitis media) y sinusitis y ocasionalmente neumonía en niños pequeños y en adultos.

La colonización de las vías respiratorias se produce en forma sinérgica con virus o bien bloqueando ellos mismos la función de depuración ciliar como vimos anteriormente en **El camino al Daño**.

En algunos niños, *H. influenzae* puede invadir los tejidos de la laringe, que lleva a edema y a la epiglotitis.

En la submucosa, las cepas capsuladas y las no capsuladas, producen una importante respuesta inflamatoria (RI), la que, en las vías aéreas bajas, llevará a una bronquitis y en las vías aéreas altas a una rinorrea solamente.

En niños pequeños *H. influenzae* tipo b (capsulado) causa bacteriemia y meningitis y ocasionalmente epiglotitis. Es el serotipo más virulento y responsable del 95% de las infecciones de sangre y meninges en esa población.

La meningitis es la manifestación aguda más grave de la infección invasiva causada por *H. influenzae* tipo b.

Por la invasión puede, además de meningitis, producir neumonía, celulitis facial, osteomielitis e infecciones de las articulaciones como la artritis séptica.

En los recién nacidos puede producir meningitis en algunos casos y la presentación es semejante a la que se comenta en la infección por *Streptococcus agalactiae* de inicio temprano, (ver **Capítulo 8**).

Si bien el mecanismo del daño es similar a lo que ocurre en neumococo y meningococo, las consecuencias parecen ser diferentes.

En la meningitis por *H. influenzae* b, el daño neurológico es mayor. Secuelas como sordera, retardo mental, ceguera e hidrocefalia obstructiva son frecuentes.

La meningitis causada por *H. influenzae* ocurre, en la gran mayoría de los casos en niños de 3 a 24 meses de vida. Existe una baja incidencia de enfermedad en los primeros meses de vida debido a que los niños nacen con anticuerpos maternos.

El inicio de la colonización ocurre desde el nacimiento, por cepas no capsuladas, Los niños menores de 2 años no forman anticuerpos contra la cápsula tipo b, por lo que el lactante queda en alto riesgo de enfermar.

Luego de los 2 años de edad los niños aumentan los títulos de anticuerpos y la enfermedad disminuye en frecuencia.

La cápsula de PRP es un antígeno timo independiente.

El mecanismo de la respuesta inmunitaria pasa por la presentación directa del antígeno y la activación del linfocito B sin participación de los linfocitos T.

Esto provoca una respuesta primaria de tipo IgM fundamentalmente, de poca duración, por lo que no estimula una memoria inmunitaria.

Hasta la edad de 18 meses, los linfocitos B del lactante están en un estado de maduración insuficiente para responder solos sin la ayuda de los linfocitos T.

Con la finalidad de lograr una respuesta eficaz en el lactante menor a 18 meses, se acopló el PRP a una proteína portadora, con lo cual se le confirió al poliósido las características de un antígeno timo dependiente. Esto determina que el mecanismo de la respuesta inmune pase por la estimulación de los linfocitos T que activan a los linfocitos B por medio de factores solubles.

Mediante este diseño, se logró la producción de anticuerpos desde los 2 meses de edad, fundamentalmente IgG con buena estimulación de la memoria inmunitaria, luego de aplicaciones repetidas.

Durante los últimos 15 a 20 años se han producido importantes cambios en la epidemiología de la meningitis bacteriana aguda. Cambios que se relacionan con una marcada declinación en la incidencia de la menin-

gitis por *H. influenzae*, debido a los programas de vacunación, en aquellos países que han adoptado la misma como obligatoria, como nuestro país.

En dichos países la meningitis bacteriana tiene al neumococo y al meningococo como los principales responsables ocurriendo en adultos más pedominantemente que en niños.

> *Streptococcus pneumoniae*

Su microbiología, los factores involucrados en la virulencia y la patogenicidad, se comentan en **Capítulo 4**.

Esta bacteria causa neumonía usualmente de tipo lobar, sinusitis, otitis media, meningitis y otras infecciones invasivas.

La colonización de la nasofaringe también está asociada a la neuraminidasa y la IgA proteasa.

Como vimos en **Capítulo 4**, varios factores secretados por neumococo han sido asociados a la injuria a las células endoteliales.

Este hecho sugiere que la diseminación es un proceso de destrucción, mediado por la liberación de estos productos.

Entre esos factores, la neuraminidasa (también producida por otros microorganismos que colonizan el tracto respiratorio), contribuye a la proliferación de neumococo en la nasofaringe y secreciones mucosas del árbol bronquial y a la posterior invasividad.

Las proteasas extracelulares, al degradar la IgA, inmunoglobulina de la defensa local, también colaboran en la colonización de mucosas.

Luego de la adherencia y colonización, se inicia la invasión de las mucosas, previo a la diseminación como vimos antes en **El camino al Daño.** La hialuronidasa contribuye a la diseminación al actuar en la matriz extracelular del tejido conectivo.

Como se comenta en **Capítulo 4**, por cualquier mecanismo que impida el funcionamiento de limpieza de las cilias del epitelio bronquial o por aumento de la producción de moco, los microorganismos no son eliminados, iniciando un proceso infeccioso, el que tendrá severidad diversa según localización de los mismos, los factores de virulencia que pone en juego y su interacción con todos los mecanismos de defensa del huésped.

Siempre se consideró a la meningitis neumocócica como el resultado de la diseminación hematógena al plexo coroideo.

Actualmente se postula que los neumococos penetran adhiriéndose a las superficies endoteliales de las meninges, dada la activación plaquetaria que la misma infección estimula en ellas.

Por estos mecanismos la autolisina está asociada también a un incremento de la virulencia del microorganismo al exponer estos componentes de la célula bacteriana a los tejidos del huésped, promoviendo mayor inflamación.

Se han encontrado evidencias que también los componentes de la pared celular pueden mediar en la adherencia a las células endoteliales, daño de importancia en esta patología.

Ya se destacó que el neumococo es el prototipo de patógeno bacteriano que produce daño mientras permanece fuera del fagocito. Por ello, las defensas del huésped transitan por las defensas humorales, anticuerpos, complemento, fagocitos en especial neutrófilos.

Si existen anticuerpos contra el polisacárido capsular, que aparecen normalmente desde la colonización, se combinan en forma específica y la bacteria queda susceptible a la fagocitosis.

Se conocen ya más de 90 serotipos capsulares diferentes, cada uno de los cuales reacciona con un antisuero diferente.

Por lo menos 18 de los serotipos conocidos son responsables del 82 % de los casos de meningitis neumocócica bacteriémica, con una estrecha correlación entre los subtipos bacteriémicos y los implicados en la meningitis.

En muchos países, desde la introducción de las vacunas conjugadas antineumocócicas se produjo una marcada disminución de aislamientos de neumococos pertenecientes a los serotipos incluidos, no así de los serotipos no incluidos.

En aquellas personas que no producen cantidad de anticuerpos suficientes, como en los que padecen mieloma múltiple, inmunodepresión y otras patologías similares, la susceptibilidad a la enfermedad neumocócica es elevada.

La meningitis por neumococo es la causa más frecuente de meningitis bacteriana en niños y adultos.

Esta frecuencia, sólo en períodos de epidemias, es superada por el meningococo.

> *Neisseria meningitidis* (meningococo)

Los primeros informes de esta enfermedad se dieron en 1805, por Vieusseux, durante una epidemia que azotó las afueras de Ginebra, Suiza.

El meningococo fue identificado por Weichselbaum hacia 1887. En el siglo XX ocurrieron grandes epidemias durante las Primera y Segunda Guerra Mundial.

La enfermedad puede presentarse en su forma endémica o epidémica.

Durante la segunda mitad del siglo XX, el serogrupo A ha sido la forma predominante. Otros serogrupos B, C, Y, W135 y X han participado en los últimos años.

Las epidemias están asociadas al hacinamiento, desplazamiento de poblaciones, factores climáticos y virulencia de las cepas circulantes.

Fuera de África y desde 1970, diversas epidemias han azotado al mundo. La incidencia de la enfermedad se ha incrementado en diversos países de América, Asia y Europa, con un patrón caracterizado por brotes recurrentes y enfermedad esporádica persistente.

Los serogrupos A, B y C producen la mayoría de casos a escala mundial, siendo los serogrupos B y C responsables por la mayoría de éstos en Europa y América. Los serogrupos A y C predominan en Asia y África.

El reservorio natural es la nasofaringe donde la bacteria coloniza asintomáticamente.

La capacidad de desarrollar enfermedad invasiva a partir de la portación depende de la cepa adquirida y de las condiciones del huésped y su entorno.

La diversidad genética es elevada en las cepas de portación, mientras que un número limitado de clones produce enfermedad invasiva.

El hacinamiento y el humo del tabaco o de la leña favorecen la diseminación y colonización, mientras que las infecciones virales y deficiencias de factores del complemento se asocian a la enfermedad invasiva.

Las características morfológicas de la bacteria son semejantes a los de *Neisseria gonorrhoeae,* bacteria que vimos en **Capítulo 8**.

Se trata de células dispuestas en diplococos gramnegativos enfrentados por su concavidad, de forma que recuerdan a granos de café.

La labilidad de esta bacteria a temperaturas mayores o menores de 37ºC y a la desecación, hace que deba tenerse presente que el LCR es una muestra clínica que debe permanecer siempre a 37ºC, de allí que insistimos en que sea transportado en contacto con el cuerpo de quien transpor-

ta la muestra y su inmediato procesamiento, manteniendo el LCR en estufa de 35ºC desde su llegada al laboratorio.

Se adjudica a la autólisis que sufren, por la diseminación de la endotoxina, tanto in vivo como in vitro, como la responsable de la rapidez en perder la viabilidad.

Usualmente se cultiva en medios con sangre y en ambiente de CO2 de 5 a 10%.

La pared celular de las neiserias contiene citocromooxidasa, enzima que posibilita la identificación de la bacteria en el laboratorio.

Si bien la disponibilidad de hierro es fundamental para las bacterias, que lo logran recurriendo a los sideróforos que producen, meningococo no elabora un sideróforo soluble para captar el hierro, sino que posee una serie de proteínas de membrana que lo captan desde la hemoglobina, de la transferrina y de la lactoferrina.

Estos microorganismos colonizan la nasofaringe posterior, su reservorio reconocido en el hombre sano y éste es su único huésped conocido natural. Esta colonización precede a la diseminación hematógena en un período determinado.

La superficie epitelial de la nasofaringe es mixta, contiene células ciliadas secretoras y no ciliadas no secretoras. La capa de moco que el microorganismo tiene que atravesar, por mecanismos aún no clarificados totalmente, recubre la superficie epitelial de las vías respiratorias. Los meningococos también se adhieren al epitelio columnar no ciliado y a la mucosa de la orofaringe. Mecanismo similar al utilizado por gonococos en la infección genital.

El meningococo utiliza diversos factores de superficie para unirse a las células no ciliadas del epitelio respiratorio.

La adhesión y achatamiento de las cilias está mediada por pilis y probablemente por otros componentes de la membrana externa, como las diversas proteínas de superficie.

Los meningococos que poseen pilis se unen más eficazmente a las células de la nasofaringe humana que los que no los poseen.

De hecho que la integridad de los epitelios faríngeos y del tracto respiratorio, es fundamental para la protección de la enfermedad invasiva.

La ruta de estos microorganismos para causar meningitis la vimos anteriormente en **El camino al Daño.**

Los casos esporádicos y brotes epidémicos de enfermedad meningocócica se asocian a brotes de infecciones respiratorias virales o por micoplasmas, las que facilitarían la invasión sistémica.

Solo los meningococos no capsulados penetran en la célula epitelial probablemente por la naturaleza hidrófila y muy polar de su cápsula, que impide las interacciones con la superficie de las células epiteliales.

Cuando el meningococo ingresó en la célula epitelial, la producción de su cápsula se interrumpe.

La expresión de la cápsula ocurre por un mecanismo de autorregulación.

Mecanismos en sistemas de autorregulación en la formación de cápsula, ya se comentó en otras bacterias **(Capítulo 5).**

Por estos mecanismos las cepas capsuladas de meningococo que llegan a la sangre tienen el sistema de formación de su cápsula conectado, mientras las cepas recuperadas de portadores nasofaríngeos no capsuladas, lo tienen apagado.

Esta regulación en la producción de la cápsula y la incapacidad de sintetizarla en los portadores sanos, es de importancia en la instalación de la enfermedad meníngea.

De ello se deduce la existencia de una regulación entre la variación de su estado capsulado a no capsulado, la invasión de la bacteria y la enfermedad meningocócica en el huésped.

Otros factores de riesgo asociados al desarrollo de la enfermedad meningocócica y vinculados al huésped son, las deficiencias de factores del complemento (C3, C5-9) y otro tipo de alteraciones del sistema inmune.

Meningococo establecerá una infección sistémica en aquellos individuos que carezcan de anticuerpos contra la cápsula o contra la pared bacteriana de esta bacteria o en aquellos sin respuesta por esos componentes del complemento.

Cuando el meningococo hace contacto con las células epiteliales y endoteliales la bacteria inicia una serie de cambios en el citoesqueleto de otras células, como la reorganización de los filamentos de actina.

Una porina del meningococo, que se puede translocar a las membranas eucarióticas, es la responsable de la reorganización de la actina, lo que posibilita que los meningococos se trasladen dentro de la vacuola donde se incorporaron, a la superficie de las células.

Luego que invaden las células de la mucosa se producirá la invasión del torrente sanguíneo y del sistema nervioso central, por mecanismos aún no del todo clarificados como vimos en **El camino al Daño**.

Además de lo ya comentado en este apartado, se conoce que, la producción de una IgA proteasa, ayuda al microorganismo a sobrevivir dentro de las células epiteliales y que el aumento de la expresión de un gen lla-

mado *pil*C y la unión mediada por el pili tiene participación en el siguiente paso, cual es el de atravesar la barrera hematoencefálica.

Algunos autores proponen que la invasión del torrente sanguíneo se realiza por un mecanismo de endocitosis dirigida por el meningococo, a diferencia de lo que se postula para *H. influenzae*, que invade por un mecanismo intercelular, ya comentado.

Contactos cercanos a un caso de meningitis meningocócica transportan el microorganismo (alrededor del 20% de ellos), antes que el primer caso sea reconocido, llegando esta portación al 80% en los picos de la epidemia.

El factor de virulencia más importante es la endotoxina o LOS (lipooligosacárido) y la cápsula polisacárida antifagocitaria.

Si bien existen diferencias entre el LOS y el LPS (en meningococo, gonococo y *Bordetella pertussis* el LOS solo contiene el core y el lípido A) la actividad biológica de todas las endotoxinas (lipido A) son semejantes. (**Capítulo 1**).

Pareciera ser que el más importante factor en la prevención de enfermedad invasiva es la presencia de IgG y de IgM.

Estos anticuerpos accionan contra los antígenos de superficie del meningococo, capsulares y no capsulares.

Alrededor del 50% de los recién nacidos tienen títulos de anticuerpos bactericidas, debido a la transmisión de la madre, los que disminuyen con la edad, llegando a ser muy escasos hacia los 6 y 24 meses.

Llegados a los 12 años los humanos elevan sus títulos de anticuerpos, alcanzando hasta el 60% la prevalencia de ellos en el adulto joven.

Estos anticuerpos aparecen como respuesta a la portación en el tracto respiratorio superior de éstas y otras neiserias no patógenas.

De la importancia de estos anticuerpos en su aparición, da cuenta la tasa elevada de ataque que sufren niños pequeños, de 3 meses a 1 año, período de tiempo de la pérdida de anticuerpos maternos.

También el sistema del complemento es de importancia en la prevención de enfermedad invasiva, como se afirma en la meningococcemia en individuos con déficit en C5, C6, C7 o C8, a pesar de tener anticuerpos protectores.

Entre el 5-30% de los individuos normales están colonizados por este microorganismo y solo algunos de ellos desarrollarán enfermedad.

Si bien se trata de una bacteria semejante morfológicamente y tintorialmente a *N. gonorrhoeae*, posee una prominente cápsula polisacárida antigénica y antifagocitaria que es un poderoso factor de virulencia y que

posibilita además la clasificación de este microorganismo en serogrupos, los que a su vez se subdividen, según proteínas de membrana externa y antígenos lipopolisacáridos.

Se han identificado 13 serogrupos : A, B, C, H, I, K, L,M, X, Y, Z, 29E y W135.

Los más importantes asociados a enfermedad invasiva son: A, B, C, Y y W135.

Un grupo de serotipos están asociados con la enfermedad meníngea, mientras otros serotipos del mismo grupo, raramente producen enfermedad.

Los grupos C y B son los de mayor significancia clínica en nuestro país, donde actualmente la tasa de incidencia ha disminuido. En el año 1993 la tasa era de 2,6 casos cada 100000 habitantes por año y ya en el año 2005 se registró una tasa de 0,6 casos cada 100000 habitantes por año, según lo informara el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) de la Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud de la Nación.

En un estudio de vigilancia de enfermedad invasiva (meningitis y/o meningococcemia) realizado en nuestro país por el Laboratorio de Referencia del Instituto Malbrán (ANLIS), en el período 2006-2011, sobre 787 aislamientos de *N. meningitidis*, de todo el país, provenientes de LCR, sangre, líquido articular, y líquido pleural, provenientes de pacientes con enfermedad invasiva, como meningitis, sepsis, bacteriemia, artritis y neumonía, el serogrupo que prevaleció fue el B (72%) en el período 2006-2007 y a partir del 2008 se incrementa notoriamente el serogrupo W135, manteniéndose como predominante hasta 2012.

En noviembre del año 2010, se licenció en nuestro país, la vacuna tetravalente conjugada para serogrupos A, C, Y, W135. (datos red SIREVA)

Relacionadas con los serogrupos encontramos a las proteínas de membrana externa, las que son designadas, clase 1 hasta la clase 5. La clase 2 y la 3 funcionan como porinas y son semejantes a la Por de gonococos, se comportan como invaginas que median la penetración en la célula huésped.

La clase 4 y 5 son análogas a la Rpm y Opa del gonococo, respectivamente.

Los serogrupos B y C han sido subdivididos a su vez en base a determinantes de serotipos localizados en las clases 2 y 3 de proteínas.

En los grupos A y C, la inmunogenicidad del polisacárido capsular parece estar en función de su tamaño molecular.

El grupo B tiene una pobre inmunogenicidad en humanos, hecho que se adjudica a su reactividad cruzada entre el tejido neonatal y el polisacárido capsular del grupo B. Estudios experimentales en animales, demostraron que estos antígenos con reacción cruzada, persisten en el sistema nervioso central a medida que el animal madura y dan sustento a que, debido a la semejanza entre los antígenos del huésped y este polisacárido, la inmunogenicidad del grupo B es tan pobre.

También de ello resulta la dificultad en lograr una vacuna eficaz en la protección contra el grupo B, en los humanos.

La clínica y el tratamiento ■ mabel rinaldi

La meningitis es una de las diez afeccioness principales del ser humano y es considerada una emergencia infectológica.

En la Argentina se dan más de 500 casos al año de meningitis purulentas, una grave enfermedad que actualmente es prevenible a través de la vacunación.

La meningitis se clasifican en bacterianas, virales y micóticas. En este espacio se tomaran las ocasionadas por bacterias.

La meningitis bacteriana aguda es una infección extremadamente grave y pueden producir la muerte o daño cerebral aún con la instauración de un tratamiento adecuado.

El pronóstico claramente dependen del rápido reconocimiento del síndrome meníngeo, de las medidas diagnósticas y el inicio oportuno del tratamiento antibiótico.

El gran desafió actual es la prevención de las meningitis purulentas especialmente en los primeros años de vida a través de la inmuno-prevención teniendo presente que las estadísticas demuestran que el 50% de los pacientes afectados son menores de tres años.

Definición

Meningitis: inflamación de las membranas meníngeas (piamadre y aracnoides) y del líquido cefalorraquídeo (LCR) que circula entre ambas por el espacio subaracnoideo, espacio que es continuo y se dispone alrededor del cerebro y de la médula espinal.

El paciente con meningitis bacteriana clásicamente se presenta con fiebre, cefalea, meningismo y signos de disfunción cerebral (confusión, delirio y disminución del nivel de conciencia).

En una revisión de 493 pacientes con meningitis bacteriana en pacientes adultos realizada por Durand en 1993 en EE.UU, encontró la clásica triada: fiebre, rigidez de nuca y cambio en el estado mental en el 75% de los casos, pero la totalidad de los pacientes presentaron al menos uno de estos síntomas.

Otros signos asociados a la clásica triada son: fotofobia, delirio, irritabilidad y convulsiones.

El meningismo puede ser de intensidad variable y acompañado por los signos de Kerning y Brudzinski.

El signo de Kerning es provocado con el paciente en posición supina con el miembro inferior flexionado hacia el abdomen y la rodilla flexionada. La pierna está en posición pasivamente extendida y en presencia de inflamación de las meninges, el paciente resiste la extensión de la pierna.

EL signo de Brudzinski se expresa cuando la flexión de la nuca resulta en la flexión de rodilla y muslo.

Ambos signos están presentes en aproximadamente un 50% de los casos y su ausencia no descarta el diagnóstico.

La parálisis de los nervios craneales III, IV, VI y VII en conjunción con signos cerebrales lo presentan entre el 10 a 20 % de los casos.

Estos nervios son afectados por la compresión que ejerce el exudado purulento sobre las vainas que rodean a cada nervio o bien puede ser secundaria al incremento de la presión intracraneal.

El déficit neurológico y las convulsiones surgen de la isquemia cortical y subcortical que resulta de la inflamación y trombosis de los vasos sanguíneos.

Hemiparesia: resulta de la presencia de colecciones subdurales y del espacio subaracnoideo subyacente, las cuales llevan a un incremento de la permeabilidad de la fina red de capilares y venas que están contenidas en la capa de la duramadre. Esta condición se autolimita aunque grandes colecciones pueden ocasionar efecto de masa y posteriormente dar origen a hemiparesia.

La presencia de papiledema (edema de papila visualizada en el fondo de ojo); este signo está presente en menos del 1% de los pacientes con infección temprana de las meninges.

El incremento de la presión intracraneal se traduce clínicamente por la presencia de coma hipertensión, bradicardia y parálisis del III par.

Signos y síntomas iniciales de pacientes con meningitis bacteriana.

Síntomas y signos	%
Cefalea	>90
Fiebre	>90
Meningismo	>85
Sensorio alterado	>85
Brudzinski	>50
Kerning	>50
Vómitos	>35
Convulsiones	>30
Signos Focales	10-20
Papiledema	<1

Es importante conocer que los clásicos signos y síntomas de meningitis bacteriana pueden estar ausentes. Por ejemplo en los neonatos, quienes no presentan usualmente meningismo.

Los signos que orientan en este grupo son: fiebre, inestabilidad térmica (hipotermia e hipertermia) llanto continuo, flaccidez generalizada, letargia, rechazo alimentario, irritabilidad, ictericia, vómito y dificultad respiratoria.

La fontanela abombada está presente en 30% de los casos, las convulsiones son observadas en 40% de los enfermos.

Niños de 1 a 4 años de edad presentan fiebre, vómito y rigidez de nunca.

Los pacientes adultos especialmente con enfermedades subyacentes como: diabetes mellitus y enfermedad cardiopulmonar, pueden presentar: letargia, obnubilación, fiebre y signos de inflamación meníngea.

En meningitis por *Streptococcus pneumoniae* los signos y síntomas de inflamación de las meninges están presentes en el 98% de los enfermos, en tanto en la meningitis causada por bacilos gramnegativos lo presentan el 75% de los pacientes.

Los pacientes añosos también pueden presentar antecedentes de bronquitis, sinusitis y neumonía.

Las bacterias son responsables del 70 % de los casos de meningitis.

Streptococcus pneumoniae es el agente etiológico más frecuente en la actualidad tanto en niños como en adultos.

En el 50% de los casos ocasionados por este germen se evidencia una puerta de entrada: otitis media aguda o crónica, mastoiditis, sinusitis, neumonía y endocarditis, y en el 20% hay antecedentes de fractura de cráneo o de base de cráneo.

La meningitis recurrente se asocia con fractura de cráneo y fístula de LCR.

Las enfermedades como alcoholismo, agamaglobulinemia, ausencia del bazo estructural o funcional y mieloma múltiple, también predisponen a la infección de las meninges.

Neisseria meningitidis es el segundo agente etiológico en orden de frecuencia y es responsable de meningitis en niños y adultos jóvenes.

Una característica distintiva de este germen es la de ocasionar meningitis en forma individual o bien provocar epidemias.

El único reservorio de esta bacteria es el hombre, forma parte de la flora normal del tracto respiratorio superior en aproximadamente 20% de la población.

Un porcentaje mayor de colonización no se correlaciona con el desarrollo de epidemia.

La transmisión de esta bacteria se realiza por vía aérea desde los portadores asintomáticos.

Haemophylus influenzae era el agente etiológico más frecuente de meningitis en niños entre los 2 meses y 5 años.

La inmunización adecuada disminuyó la frecuencia y la posicionó en tercer lugar (la vacuna está contenida en el plan de inmunización de Argentina) por lo cual hoy la infección de las meninges por *H. influenzae* se presenta en poblaciones no inmunizadas.

En pacientes adultos el desarrollo de meningitis deja en evidencia la existencia de factores predisponentes como esplenomegalia o agammaglobulinemia.

Bacilos gramnegativos son responsables de meningitis en pacientes con antecedentes de cirugías neurológicas o de anestesia espinal. En general predominan: *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Pseudomona aeruginosa*, *Acinetobacter baumanni* y *Serratia* spp.

La forma espontánea es una rara complicación de bacteriemia y es por lo general patrimonio de pacientes en ambos extremos de la vida (neonatos y ancianos).

La puerta de entrada para esta bacteriemia son las infecciones urinarias e infecciones intraabdominales.

Staphylococcus aureus es otro agente etiológico que ocasiona infección de las meninges en pacientes con antecedentes de cirugías neurológicas o implante de sistema de derivación ventrículo peritoneal.

Staphylococcus aureus también tiene la capacidad de ocasionar meningitis y/ o absceso cerebral en pacientes con bacteriemia por este germen.

Listeria monocytogenes es responsable de meningitis en pacientes con inmunidad celular disminuida, neonatos, ancianos y en huéspedes inmunosuprimidos por trasplantes, leucemias y linfomas. Curiosamente no es común en pacientes con Sida.

Mycobacterium tuberculosis es agente etiológico más común en paciente con meningitis granulomatosa en nuestro medio.

La infección de las meninges se presenta en pacientes con infección diseminada o bien es secundaria a reactivación de focos silentes asociados o no a trastorno de la inmunidad celular.

El antecedente de contacto con enfermo lo presenta el 20 - 30 % de los casos.

Manifestaciones clínicas

La sospecha de meningitis se basa en la presencia de síntomas y signos.

La meningitis bacteriana es una emergencia médica por lo cual se debe internar al paciente y rápidamente realizar los estudios diagnósticos correspondientes y luego iniciar el tratamiento antibiótico y soporte médico según la condición clínica del paciente y de sus antecedentes epidemiológicos.

El cuadro clínico está constituido por fiebre, cefalea intensa y generalizada, vómitos y mialgias.

La irritación meníngea es responsable de la rigidez de nuca y de los signos de Kerning y Brudzinsky.

Estos síntomas y signos siempre están acompañados de alteraciones variables del estado de conciencia.

Por la forma de presentación y evolución del cuadro clínico se puede caracterizar a las meningitis como de evolución aguda, subaguda y crónica.

Meningitis aguda, el 10% de todas las meningitis se presentan de esta forma.

El meningococo y neumococo son los agentes predominantes en este tipo de presentación. Se trata de pacientes con antecedentes de infección

de las vías aéreas: otitis, sinusitis y neumonía, que en 24 horas o menos, el paciente desarrolla un cuadro meníngeo completo.

La meningococcemia puede expresarse como una meningitis de evolución fulminante que se caracteriza por fiebre, cefalea, fotofobia y rigidez de nuca y distinto grado de compromiso neurológico de inicio abrupto, presencia de rash maculopapular en el tronco, que rápidamente se transforma en petequial de 1-2 mm en las superficies de extensión de los miembros, palmas, plantas y conjuntivas.

Desaparecen con la vitropresión y posteriormente se tornan hemorrágicas y confluentes que se asocia con hipotensión, falla multiorgánica, y hemorragia adrenal aguda (síndrome de Waterhouse-Friderichsen).

Otra forma de presentación es la que se expresa con signos y síntomas de meningitis de evolución aguda que se complica con coagulación intravascular diseminada.

Estas formas clínicas presentan gran morbilidad y secuelas y mortalidad de más del 40%.

El 50% de los casos de meningitis por meningococo presentan lesiones cutáneas: puntillado, máculas o bien áreas grandes de color violáceo purpúrico.

En todo paciente con meningitis estas lesiones deben ser siempre buscadas.

Meningitis subaguda: es la evolución más frecuente, el lapso desde el inicio de los signos y síntomas de infección meníngea hasta el diagnóstico es de 1 - 5 días.

El 75 % de las meningitis bacterianas y virales se presentan con este cuadro.

En la de origen bacteriano se presenta con manifestaciones similares a las descriptas en las formas fulminantes y en más de la mitad de las meningitis granulomatosas en especial la tuberculosa.

La meningitis subaguda evoluciona en forma subaguda pero con empeoramiento progresivo del sensorio y compromiso de pares craneales.

Meningitis crónica: los signos y síntomas de infección meningea se presentan en el transcurso de 3 semanas e incluso meses.

La fiebre y signos meníngeos son mínimos, predomina la cefalea, trastorno de personalidad y de la conciencia por lo cual pueden llevar a la interpretación de un cuadro de origen psiquiátrico.

Esta forma de presentación es patrimonio de las infecciones granulomatosas.

La infección meníngea por *Listeria monocytogenes* también puede presentarse como meningitis crónica.

La evolución de la meningitis crónica se caracteriza por oscilaciones espontáneas pero es progresiva y mortal sin tratamiento.

En el examen neurológico además de los signos meníngeos se encuentra trastorno de la conciencia. El meningococo produce excitación con agresividad y manía.

El 50% de los pacientes con meningitis por neumococo ingresan en coma, con convulsiones el 20-30% y signos de foco neurológico 10-18% de los casos.

Estas alteraciones son secundarias al compromiso cortical por vasculitis y deben diferenciarse de hipoglucemias o neurotoxicidad por antibióticos y de afección pos síndrome convulsivo.

El diagnóstico, tratamiento y pronóstico de la meningitis bacteriana depende del rápido reconocimiento de los signos y síntomas de la infección de las meninges.

Ante la sospecha de meningitis se debe proceder con urgencia, realizar una punción lumbar (PL) y solicitar la determinación físico-químico, tinción de Gram y cultivo del LCR y de sangre.

En determinadas circunstancias la PL debe ser demorada, ante la sospecha del diagnóstico y sobre todo cuando se considera que los signos y síntomas de síndrome meníngeo pueden ser secundarios o estar acompañado de lesiones que incrementan la presión endocraneana como abscesos y tumores cerebrales.

Los pacientes inmunocomprometidos tienen alta posibilidad de presentar este tipo de lesiones y por lo cual se debe recurrir a diagnóstico por imagen (Resonancia Magnética (RMN) y Tomografía Axial Computada (TAC).

En los pacientes con síndrome meníngeo que requieren la realización de estudios por imágenes corren el riesgo de presentar un retraso en el diagnóstico y de recibir tratamiento adecuado.

La demora en el inicio de tratamiento antibiótico se correlaciona con aumento de la morbilidad y mortalidad, por lo cual se recomienda que en estos pacientes se realicen hemocultivos y se inicie tratamiento empírico inicial, a fin de evitar incremento en la morbilidad y mortalidad.

El diagnóstico por imagen debe preceder a la PL en pacientes que presentan convulsiones de reciente inicio, en pacientes inmunocomprometidos y en quienes desarrollan signos de hipertensión endocraneal.

La PL puede ser peligrosa en pacientes con signos de hipertensión endocraneal por el riesgo de presentar hernia cerebral posterior al retiro de líquido cefalorraquídeo.

La PL también está contraindicada en pacientes que presenten alteración de la coagulación por la posibilidad de inducir a una hemorragia subaracnoidea o al desarrollo de hematomas espinales y epidurales.

La elección del tratamiento se elige en función de los antecedentes epidemiológicos, edad y de los factores predisponentes de infección meníngea.

Aunque el tratamiento antibiótico previo disminuye la probabilidad de rescate bacteriano en el cultivo.

Las alteraciones de las características físico-químicas del LCR como: aumento de la concentración de proteínas, disminución de los valores de glucosa, recuento celular elevado con predominio de polimorfonucleares y las características de la tinción de Gram y de los cultivos sanguíneos pueden ofrecer fuertes evidencias que soporten el diagnóstico y guíen la terapia antibiótica adecuada.

La apariencia microscópica del LCR depende de la presencia y concentración de células, bacterias y/o proteínas.

En meningitis bacteriana aguda no tratada, el conteo de leucocitos es de 1.000-5.000 células/mm^3 con predominancia de polimorfonucleares entre 80-90%, aunque es necesario saber que aproximadamente un 10% de los pacientes con meningitis bacteriana aguda presentan un predominio linfocitario (más de 50 % de linfocitos o monocitos en LCR).

La hipoglucorraquia menor a 40 mg/dl lo presentan el 50 a 60% de los pacientes y una relación de la concentración de glucosa en sangre/ LCR menor o igual a 40 mg/dl en adulto y de 60 mg/dl en neonatos tiene una sensibilidad y especificidad de 80% y 98% para el diagnóstico de meningitis bacteriana respectivamente.

Los cultivos del LCR son positivos en 70 a 85% de los pacientes que no recibieron tratamiento antibiótico y requieren un mínimo de 48 horas para la identificación de la bacteria.

Un test diagnóstico rápido puede ser útil para determinar la etiología de meningitis en determinadas circunstancias.

Tinción de Gram

El examen de la tinción de gram del LCR permite una rápida identificación del germen causal en 60-90% y con especificidad del 97% de las meningitis contraídas en la comunidad.

La posibilidad de la visualización de las bacterias en la coloración de Gram depende de la concentración de las mismas. Una concentración de menor a 10^3 UFC/ml (Unidad Formadora de Colonias) se asocia con un resultado de 25% de visualizar gérmenes en la tinción.

Este resultado aumenta al 60% si la concentración de bacterias es entre 10^3 y 10^5 UFC/ml.

Una concentración de bacterias superior a 10^5 UFC/ml se asocia con un 97 % de positividad en la tinción de Gram.

Se considera que la posibilidad de tener una tinción de Gram positiva depende, además de las UFC/ml, del agente etiológico de la meningitis.

Dicha posibilidad es de 90% cuando el patógeno es *Streptococcus pneumoniae*, de 86% si se trata de *Haemophilus influenzae* y 75% para *Neisseria meningitidis.*

Cuando el patógeno es un bacilo gramnegativo la posibilidad llega al 50% y sólo al 35% cuando el patógeno es *Listeria monocytogenes*.

> Determinación de la concentración de lactato

La determinación de la concentración de lactato puede ser útil para diferenciar la meningitis bacteriana de la no bacteriana, en pacientes que no han recibido tratamiento antibiótico previo.

Una concentración de 14.2 mmol/L se correlaciona con una sensibilidad de 96% y especificidad de 100% para meningitis bacteriana.

Se debe tener presente que a pesar de una sensibilidad alta y de ser un predictor positivo de meningitis bacteriana, no es un método diagnóstico certero.

Determinados factores como: hipoxia e isquemia cerebral, glucosis anaeróbica y el metabolismo alterado de los leucocitos pueden elevar la concentración de lactato en el LCR.

Sí es un elemento que provee una información adicional que puede ser útil para sostener un diagnóstico presuntivo.

La determinación de la concentración de lactato no está recomendada para pacientes con sospecha de haber adquirido meningitis bacteriana en la comunidad.

La determinación de lactato es útil para el diagnóstico de meningitis en pacientes que se encuentran en postoperatorio de cirugía neurológica y es de mayor utilidad que el coeficiente de glucosa LCR/sangre.

Una concentración de 4 mmol/l tiene una sensibilidad de 88% y especificidad de 98% con valor predictivo positivo de 96% y valor predictivo negativo de 94%.

Por ello la terapia antibiótica se debe iniciar en paciente con sospecha de diagnóstico de meningitis pos procedimiento neuroquirúrgico y que presente un valor de lactato de 4 mmol.

> Determinación de concentración de proteína C reactiva (PCR)

La determinación de la concentración de PCR puede ser de utilidad para diferenciar meningitis de etiología bacteriana de la meningitis viral.

Su utilidad está demostrada por estudios que convalidan la diferenciación de meningitis bacteriana en pacientes que presentan LCR con tinción de Gram negativa.

La determinación de PCR en LCR tiene una sensibilidad que oscila entre 18% a 100% y especificidad de 75% a 100%, con un valor predictivo negativo de 96% para el diagnóstico de meningitis de etiología bacteriana si la determinación de PCR en LCR es normal.

Tratamiento

El objetivo que persigue el tratamiento antibiótico de la meningitis bacteriana apunta a la erradicación del germen del LCR.

El antibiótico seleccionado debe reunir determinadas características a saber:

- Poder de penetración (permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica) concentración y actividad bactericida en las meninges y en LCR purulento.

- Proveer una cobertura del 90 % de los agentes etiológicos presuntivos que se determina según las características epidemiológicas de los pacientes.

La elección de la terapia antibiótica está basada en el conocimiento de los agentes etiológicos que más frecuentemente están involucrados en la infección meníngea, acorde a la edad del paciente, la forma clínica de presentación, los signos extraneurológicos encontrados en el examen físico y el patrón de sensibilidad antibiótica.

El tratamiento antibiótico empírico inicial podrá ser modificado.

Basado en los resultados de los cultivos y el patrón de susceptibilidad, cuando éstos estén disponibles, se transformará o no la terapia empírica.

En el tratamiento antibiótico empírico inicial se utilizan las cefalosporinas de 3ra generación (cefotaxime o ceftriaxona).

En regiones donde se reportan alrededor de un 10% de cepas de neumococos penicilino resistente, la combinación de ceftriaxona o cefotaxime más vancomicina debe ser administrada empíricamente hasta la obtención de los cultivos.

Esquema antibiótico empírico inicial

Haemophylus influenzae tipo b	cefalosporina de 3ra generación
Neisseria meningitidis	penicilina o ampicilina
Streptococcus pneumoniae	cefalosporina de 3ra generación
Listeria monocytogenes	ampicilina o penicilina
Streptococcus agalactiae	ampicilina o penicilina
E. coli	cefotaxime o ceftriaxona

Tratamiento antibiótico electivo y alternativa

	Elección	Alternativa
Enterobacteriaceae	cefalosporina 3ra generación	fluorquinolona meropenen
Pseudomona aeruginosa	ceftazidime	fluorquinolona meropenen
Listeria monocytogenes	penicilina o ampicilina	trímetoprima sulfametoxazol
Streptococcus agalactiae	penicilina o ampicilina	cefalosporina de 3ra generación
Staphylococcus aureus meticilino sensible y meticilino resistente	vancomicina	
Staphylococcus epidermidis		

Complicaciones

Las complicaciones neurológicas agudas pueden ocasionar consecuencias adversas.

- En los niños la sordera es una de las complicaciones más frecuentes
- La pérdida o la disminución de la audición frecuentemente se presentarán durante los primeros días de la enfermedad y esta disfunción es de tipo sensorial y por lo general es irreversible.
- Esta seria complicación puede ser prevenida con el tratamiento adecuado de la meningitis.
- La infección meníngea durante el período neonatal y las provocadas por *S. pneumoniae* y bacilos gramnegativos tienen mayor riesgo para la pérdida de la audición o bien para presentar daños cognitivos o alteraciones de la conducta y un pobre rendimiento intelectual que se evidenciará en la edad escolar.
- En el paciente adulto las complicaciones incluyen al infarto cerebral, hemorragia cerebral, sepsis, distress respiratorio y coagulación intravascular diseminada.
- Los signos de infarto cerebral y el edema citotóxico son secundarios a arteritis o endoarteritis y tromboflebitis venosa.

- Los pacientes mayores de 60 años presentan mayor riesgo para el desarrollo de complicaciones sistémicas como neumonía, fallo cardíaco, insuficiencia respiratoria y sepsis.
- Los pacientes jóvenes presentarán complicaciones neurológicas: coma, convulsiones y un incremento en el riesgo de muerte dentro de las primeras 24 a 48 horas de la enfermedad.

Terapia adicional con dexametasona

Un reciente trabajo randomizado placebo control que involucro a 301 pacientes adultos con diagnóstico de meningitis bacteriana basado en las características del líquido cefalorraquídeo con más de 1000 leucocitos por ml y de la tinción de Gram. En este trabajo se administró tratamiento con dexametasona antes del inicio del tratamiento antibiótico y quedó demostrada la reducción de riesgo desfavorable de 25% a 15% y la mortalidad se redujo de 15% a 7%.

El beneficio fue mayor en pacientes con severidad intermedia que fue definida por la escala de coma de Glasgow 8 a 11.

La escala de Glasgow se utiliza para medir el nivel de conciencia de pacientes con traumatismo craneoencefálico. Para determinarlo se utilizan como indicadores: apertura ocular, respuesta verbal y respuestas motoras. Nivel normal 15, valor mínimo 3.

En pacientes con meningitis neumocócica la morbilidad declinó del 52% a 26% y la mortalidad se redujo de 34% a 14%.

El beneficio demostrado con la administración de dexametasona resultó en la reducción de la morbi-mortalidad.

La dexametasona se administró a razón de 10 mg cada 6 horas.

La primer dosis se administró antes o bien con la primer dosis de antibiótico y se continuó con la administración de dexametasona por 4 días en pacientes con meningitis bacteriana independiente de la severidad clínica.

El beneficio es solo para la meningitis de origen bacteriano, por lo cual si ésta se descarta, la administración de dexametasona debe ser suspendida.

El beneficio se demostró para la meningitis bacteriana ocasionada por *Streptococcus pneumoniae*, por lo cual algunos autores sostienen que la dexametasona debe ser suspendida si la meningitis es causada por una bacteria diferente a este germen.

En una reciente revisión realizada en el año 2002 por de Gans, que incluyó a cinco trabajos, el tratamiento con corticoides fue asociado con una reducción en la mortalidad y secuelas neurológicas en la meningitis ocasionada por *Streptococcus pneumoniae*.

En un subgrupo de pacientes con meningitis meningocócica el riesgo de mortalidad y secuelas neurológicas si bien fueron menores, este resultado no fue estadísticamente significativo.

El inicio de corticoides antes de la primer dosis de terapia antibiótica parenteral parece ser más efectiva que cuando se la inicia luego de la primer dosis de antibiótico.

En un trabajo experimental con animales en meningitis inducida con neumococos se evidenció que la concentración bacteriana en el líquido cefalorraquídeo antes de iniciar la terapia parece ser el factor más importante para inducir una respuesta inflamatoria luego de la administración de la primer dosis de antibiótico y que esta respuesta inflamatoria, puede ser aminorada con la administración de dexametasona antes del inicio del tratamiento antibacteriano.

Segunda punción lumbar

- El análisis del líquido cefalorraquídeo debe ser repetido solo en pacientes que no han respondido clínicamente luego de 48 horas de tratamiento antibiótico adecuado, en pacientes con meningitis por neumococo resistente a penicilina o resistente a cefalosporina de 3ra generación o en aquellos pacientes que están recibiendo tratamiento con vancomicina más terapia adyuvante con dexametasona.
- La dexametasona reduce la inflamación del líquido cefalorraquídeo y disminuye la permeabilidad de la barrera hematocerebral para vancomicina y como consecuencia la adecuada penetración de este antibiótico dentro del espacio subaracnoideo.
- La otra indicación para la realización de una segunda PL es en meningitis bacteriana ocasionada por bacilos gramnegativos.

Prevención

La inmunización adecuada es la mejor prevención para obtener una disminución de las meningitis bacterianas más frecuentes.

- Vacuna contra el ***Haemophilus*** *influenzae* (vacuna Hib) en los niños ayuda a prevenir este tipo de meningitis. Esta vacuna forma parte del calendario nacional de inmunización. Se aplica a los 2-4 y 6 meses, con una dosis de refuerzo a los 18 meses.
- Vacuna antineumocócica conjugada está indicada en menores de 2 años. Vacuna incorporada al calendario nacional de inmunización. **"La aprobación de la vacuna 13 valente en la Argentina es un paso muy importante en la prevención de la enfermedad por neumococo, que afecta anualmente a miles de niños en todo el país. Esta vacuna tendrá un impacto muy importante para evitar meningitis, sepsis, neumonía y otitis media por neumococo"**.

Vacuna antineumococica polisacárida de 23 serotipos está recomendada en:

- Pacientes mayores de 60 años con enfermedades comórbidas: insuficiencia cardiaca crónica, insuficiencia renal crónica, enfermedades bronco-obstructivas, insuficiencia hepática, diabetes mellitus, pacientes esplenectomizado y asplenia funcional. Estas dos últimas condiciones tienen indicaciones de inmunización independiente de la edad y con un período de revacunación cada 5 años.
- Pacientes con fístula de LCR y en quienes presenten implante cloquear.
- Pacientes con enfermedades onco-hematológicas en tratamiento quimioterápico o radioterapia o en aquellos que reciben inmunosupresores por tiempo prolongado.
- Pacientes con infección por virus VIH SIDA que presenten un conteo de CD4 de más de 200 células/ ml.

Vacuna meningocócica serogrupos A y C se recomienda para:

- Pre-adolescentes 11-12 años y adolescentes sin inmunización previa y que ingresan a la escuela secundaria (alrededor de los 15 años).
- Estudiantes universitarios, miembros de las fuerzas armadas, equipo de deportistas que no hayan sido inmunizados y que estén viviendo en residencias comunitarias.
- Niños de dos y más años, esplenectomizados o que tengan otras alteraciones con su sistema inmunitario.
- Personas que viajan a países donde son comunes las enfermedades causadas por el meningococo (se sugiere consulta médica).

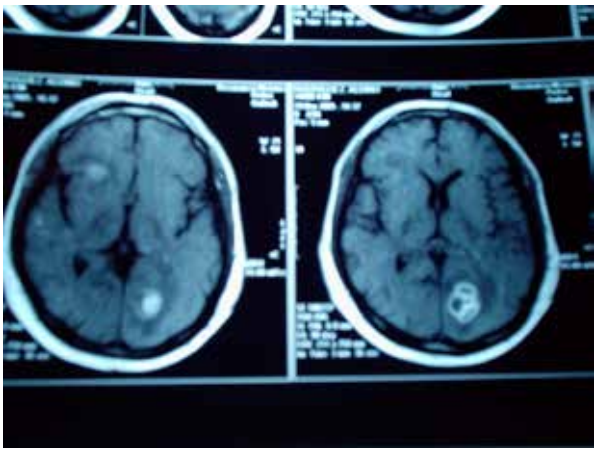
- Algunas comunidades realizan campañas de vacunación después de un brote de meningitis meningocócica.

Profilaxis

La profilaxis antibiótica debe ser administrada a los contactos estrechos de pacientes con meningitis meningocócica.

Los antibióticos que se recomiendan para la profilaxis en esta situación son: rifampicina, ciprofloxacina y ceftriaxona.

Paciente con meningococcemia. Observe las lesiones maculo papulares dismorficas purpurica en tronco y abdomen.



Arch. argent. pediatr. v.105 n.5 Buenos Aires sep./oct. 2007.

Paciente con diagnóstico de absceso cerebral. Observe absceso en lóbulo occipital derecho imagen hiperintensa que refuerza con el contraste Meningitis bacteriana: factores de riesgo para el desarrollo de complicaciones agudas.

El laboratorio ■ margarita laczeski

La morbilidad y mortalidad asociadas a meningitis bacteriana exige la determinación exacta del agente etiológico y de la población de riesgo para determinar las medidas de salud pública y asegurar el manejo adecuado de la infección.

La meningitis es una urgencia médica a cualquier edad y requiere diagnóstico y tratamiento precoz.

Durante el diagnóstico de meningitis, es necesario considerar a esta infección como un "continuo" y no circunscripta exclusivamente a meninges, y encuadrarla en el concepto más amplio de enfermedad invasiva.

Considerando lo anterior la muestra no debe limitarse únicamente a LCR, sino que muestras de sangre (hemocultivos) o de sitios paramenígeos, pueden ser de utilidad en el diagnóstico.

La mayoría de todos los casos notificados de meningitis bacterianas en el mundo, son causadas por *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*.

Otros agentes etiológicos cuya frecuencia varía con la edad, son: *Streptococcus* hemolíticos (especialmente grupo B), *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli.* Menos comúnmente, pero con frecuencia cada vez mayor, se aíslan miembros del grupo: *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (KES), *Staphylococcus aureus, Salmonella* spp*., Pseudomonas aeruginosa,* entre otros.

Los casos aislados de meningitis aguda bacteriana ocurren en edades extremas de la vida, aun cuando el 75 % de todos los casos notificados ocurren en niños menores de 15 años.

La correcta utilización del recurso bacteriológico resulta de importancia fundamental.

La contribución del laboratorio de microbiología incluye: el diagnóstico etiológico, la búsqueda y seguimiento de los portadores, la determinación del serogrupo, serotipo, subtipo o inmunotipo causal o predominante cuando corresponda, así como pruebas de sensibilidad "*in vitro*" a los agentes antibacterianos.

El diagnóstico de meningitis puede hacerse mediante el aislamiento de los organismos de sangre o de LCR o bien mediante determinaciones serológicas llamadas .pruebas rápidas.

El estudio del Líquido Cefalorraquídeo (LCR):

Los métodos clásicos de observación de frotis coloreado por tinción de Gram y cultivo en medios adecuados de LCR y hemocultivos, siguen siendo los métodos de referencia.

El cultivo de LCR es la técnica "gold estándar" para el diagnóstico de meningitis bacteriana aguda porque permite identificar el agente y obtener su sensibilidad a antimicrobianos.

Para optimizar el diagnóstico de meningitis bacteriana es necesario tener en cuenta los siguientes aspectos:

a. Población bacteriana normal: ninguna (sitio estéril).

b. Patógenos:

Cuadro 1. Bacterias frecuentes en infecciones del sistema nervioso central.

Meninges	- *Haemophilus influenzae* (niños de 6 meses a 4 años y ancianos o inmunodeprimidos) - *Streptococcus pneumoniae* (neumococo) - *Neisseria meningitidis* (meningococo) - *Escherichia co*li, otros bacilos entéricos gramnegativos y - *Pseudomonas aeruginosa* - *Staphylococcus aureus* (en la mayoría de los casos como consecuencia de una cirugía o rotura de un foco parameníngeo) - *Mycobacterium tuberculosis* - *Streptococcus* (grupos B o D en neonatos) - *Listeria monocytogenes* - *Leptospira* spp. - *Treponema pallidum*
Abscesos cerebrales y otros focos parameníngeos	- *Streptococcus* spp. - *Peptostreptococcus* spp. - *Bacteroides* spp. - *Staphylococcus aureus* -*Propionibacterium* (difteroides anaeróbicos) - Bacilos entéricos gramnegativos - *Streptococcus pneumoniae* - *Mycobacterium tuberculosis* - *Haemophilus influenzae* - *Listeria monocytogenes*

Cuadro 2. Agentes etiológicos bacterianos probables según edad en meningitis.

Neonatos		- *Escherichia coli* - *Streptococcus agalactiae* (del Grupo B) - *Klebsiella pneumoniae* - Otros gramnegativos: enterobacterias, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter baumanni*. - *Listeria monocytogenes*
Lactantes		- *Streptococcus pneumoniae* - *Haemophilus influenzae* tipo “b” - *Neisseria meningitidis*
Adultos	No traumáticas	*Neisseria meningitides* *Streptococcus pneumonia*
	Traumáticas:	*Staphylococcus aureus* (infección inmediata). *Pseudomonas aeruginosa* *Escherichia coli* (ambos, en infecciones de más de tres días)

Comentarios

A pesar de que el cuadro clínico y la epidemiología puedan brindar datos que acerquen un diagnóstico correcto de meningitis, son insuficientes, por lo cual debe recurrirse a la punción lumbar.

En todos los pacientes bajo sospecha de meningitis debe hacerse un estudio completo de LCR, no solamente bacteriológico sino químico y citológico.

La rápida identificación del agente etiológico, es de fundamental importancia para establecer un diagnóstico y tratamiento correctos, que van a incidir en el curso y secuelas de esta patología.

Obtención de la muestra

El LCR debe obtenerse antes de instalar el tratamiento antimicrobiano, siempre que la situación lo permita.

La toma de muestra de LCR es una técnica invasiva y debe hacerla personal con experiencia y en condiciones asépticas.

Junto a la toma de LCR debe realizarse la toma de hemocultivos a fin de aumentar la probabilidad de hallazgo microbiológico, dado que la mayoría de los microorganismos llegan a meninges por vía sanguínea.

La muestra de LCR se recoge en dos tubos estériles, que se envían al laboratorio, uno para estudio citoquímico y el otro para estudio microbiológico.

Si solo se dispone de un tubo o muy poca muestra, debe enviarse para microbiología.

Con el fin de preservar la viabilidad de los microorganismos, es recomendable colocar en un frasco de hemocultivo una porción del LCR obtenido.

El envío al laboratorio de bacteriología debe ser inmediato, la demora amenaza la viabilidad de los patógenos delicados como meningococo que es muy lábil al oxígeno y puede perder viabilidad luego de 15 minutos.

El transporte debe realizarse cuidando que la temperatura de la muestra se conserve a 35 a 37°C. Esto se logra fácilmente manteniendo el tubo con el LCR en la mano cerrada o próximo al cuerpo de quien lo transporta hasta su llegada al laboratorio.

> Procesamiento de la muestra

El material debe ser procesado inmediatamente. Si esto no fuera posible, mantener el espécimen en estufa a 35ºC y sembrarlo lo antes posible.

Examen macroscópico:

Observar y anotar las siguientes características: cantidad aproximada, aspecto, presencia de coágulos, color, presencia de sangre, red de fibrina.

El examen macroscópico puede informarse en observaciones si el LCR presenta características particulares: turbio, hemorrágico, xantocrómico, etcétera.

Examen microscópico:

Es rápido, sencillo y de bajo costo.

Permite realizar el diagnóstico preliminar con rapidez. Su sensibilidad varía entre 25–97% dependiendo del inóculo bacteriano presente inicialmente en la muestra y tiene una especificidad del 100%.

Un inóculo bacteriano inicial < a 10^3 UFC/ml, arroja una sensibilidad diagnóstica por microscopía de 25%, mientras que un recuento > 10^5 UFC/ml eleva la sensibilidad a 97%.

Procedimiento:

1. Centrifugar el LCR en forma estéril a 1000 rpm durante 10 minutos.
2. Separar el sobrenadante en forma estéril.
3. Tomar una ansada del sedimento y realizar un extendido sobre un portaobjetos nuevo, enjuagado con alcohol y seco.
   Si el material es muy espeso, se puede diluir con una gota de solución fisiológica.
4. Dejar secar.
5. Repetir los pasos 3 y 4 tres veces en total depositando el material en el mismo lugar del portaobjeto. Tiene por objetivo concentrar la muestra y aumentar la sensibilidad.
6. Fijar a la llama y colorear con coloración de Gram.
7. Observar.

> **Lo observado en la microscopía debe ser informado al médico tratante de inmediato, verbalmente o por escrito. Esta actitud, es una obligación del profesional de laboratorio y puede salvar una vida o evitar secuelas.**

Se debe informar:

- presencia o no de respuesta inflamatoria (aclarando predominio celular observado – polimorfonucleares o mononucleares).
- presencia o no de bacterias (indicando características tintoriales, disposición y morfología).

Los organismos grampositivos como *Streptococcus pneumoniae* se detectan con mayor facilidad que *Haemophilus influenzae* o *Neisseria meningitidis*, puesto que éstos pueden pasar inadvertidos entre el fondo y los núcleos rosados de los leucocitos.

Meningococo y *Haemophilus* son difíciles de detectar en las coloraciones directas, pues suelen estar enmascarados o aún confundirse con detritus celulares o restos de fibrina.

Tener presente los artificios de coloración porque es frecuente cometer los siguientes errores:

a. Interpretación de una coloración de Gram precipitada (artificio de coloración) como cocos grampositivos.
b. Observar cápsulas falsas por la técnica de coloración o por falta de foco al observar al microscopio puede confundir con *Streptococcus pneumoniae.*
c. Interpretación errónea de *Haemophilus influenzae* con coloración bipolar, como *Streptococcus pneumoniae* decolorados en exceso.

Para evitar estas confusiones se deberán tomar ciertas precauciones:

1. Siempre que existan dudas la coloración debe repetirse.
2. Se la duda persiste y se sospecha de fallas debidas a los colorantes, los mismos deben volver a prepararse y repetir la coloración.
3. Si la inseguridad aún se mantiene luego de los procedimientos anteriores, resulta útil preparar un frotis que contenga, en el mismo portaobjeto, microorganismos identificados y de reacción tintorial conocida y la muestra analizada, esto permitirá un control de técnica y colorantes.

Se deberán realizar además coloraciones con azul de metileno, preparados con tinta china, coloración acido-alcohol resistente.

La presencia de diplococos gramnegativos, intra y extracelulares orienta el diagnóstico hacia *Neisseria meningitidis,* aunque es muy difícil diferenciar, por observación microscópica de *Mima* y *Moraxella*, de morfología similar, aunque exclusivamente extracelulares.

El hallazgo de bacilos cortos o cocobacilos, pequeños, tenues, pleomórficos, gramnegativos, hace pensar en *Haemophilus influenzae*, especialmente en niños.

Listeria monocytogenes (bacilo grampositivo semejante a difteroides), puede presentarse intra o extracelular, dispuesto en pares, forma de V o empalizadas.

El examen directo de un LCR debe ser realizado con detenimiento, método y experiencia.

No dar un informe definitivo hasta completar el estudio del cultivo, ya que las bacterias pueden ser muy escasas o estar enmascaradas.

Un resultado negativo no excluye meningitis bacteriana.

El resultado se altera por instauración de tratamiento antimicrobiano previo.

Cultivos:

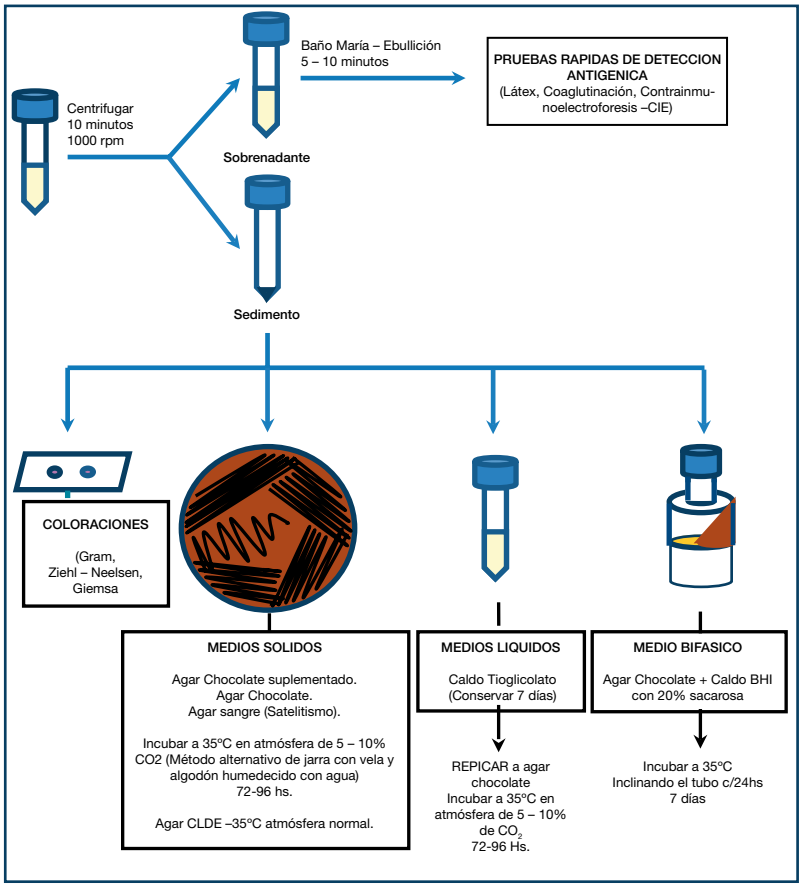
Proporcionan un diagnóstico etiológico preciso y permiten realizar pruebas de sensibilidad a antimicrobianos dentro de 48–72 hs.

Con la colonia aislada e identificada por cultivo, se puede determinar además el serogrupo, serotipo y subserotipo de los agentes más frecuentes. Para meningococo que suele producir muchos casos en corto tiempo, estos métodos serológicos permiten la identificación de brotes. Para neumococo que generalmente no produce epidemias, las pruebas serológicas permiten conocer la cepa circulante y la cobertura que presenta la vacuna de acuerdo a su composición respecto al serotipo de la cepa aislada.

Procesamiento:

Se siembra el sedimento obtenido por centrifugación y el sobrenadante se reserva para otras pruebas diagnósticas.

Para la siembra del material se utilizarán medios de cultivo enriquecidos: agarizados, caldos y medios bifásicos.



Flujograma 1. Procesamiento bacteriológico inicial del líquido cefalorraquídeo.

El sedimento de LCR se toma con ansa ojal estéril, luego de tomar la muestra, se estría la placa con la técnica de siembra para aislamiento, pero sin quemar el ansa entre estrías.

El medio más enriquecido es el agar chocolate suplementado (con Britalex®, Isovitalex®, Vitox®). Por su composición (agregado del complejo vitamínico y cofactores) actúa de enriquecimiento para los microorganismos fastidiosos y permite el desarrollo de bacterias comunes, con obtención de colonias más desarrolladas en tamaño.

Cuando no se dispone de suplemento vitamínico, el agar chocolate es un medio rico que permite el desarrollo de *Haemophilus, Neisseria* y neumococo además de bacterias comunes (enterobacterias, *Pseudomonas, Staphylococcus* spp.*),* igual que el anterior.

El agar sangre, al cual se le cruza una estría de estafilococo (productor de factor V), permite obtener desarrollo de *Haemophilus influenzae* alrededor de la estría (satelitismo), además de estreptococos, neumococos, micrococos, estafilococos, bacilos entéricos, pudiendo además evaluarse los diferentes tipos de hemólisis.

No utilizar como agar base para la preparación de agar sangre un medio que contenga azúcares, éstos interfieren en la producción de hemólisis.

La atmósfera con 5 a 10 % de CO_2 esencial para el desarrollo de meningococo, es beneficiosa para muchas bacterias. Esta atmósfera se logra colocando una vela encendida y un algodón humedecido en un recipiente hermético.

Cuadro 3. Medio y condiciones de cultivo utilizados para recuperación de bacterias frecuentes en meningitis.

Medio de cultivo	Temperatura de incubación	Atmósfera	Microorganismos que desarrollan
Agar Thayer- Martin	35ºC	CO_2	*Neisseria meningitides*
Agar chocolate	35ºC	CO_2	*Haemophilus*, *Streptococcus*, *Neisseria meningitidis* y bacterias comunes
Agar chocolate con Suplemento Vitamínico (1%)	35ºC	CO_2	*Neisseria meningitidis*, *Haemophilus*, *Streptococcus* y bacterias comunes
Agar sangre + estría de Staphylococcus	35ºC	CO_2	*Haemophilus*, *Streptococcus* y bacterias comunes
Agar lactosado	35ºC	Común	Bacilos entéricos, *Pseudomonas aeruginosa*
Medio bifásico: Agar chocolate + Caldo infusión cerebro-corazón (BHI) con 20% Sacarosa	35ºC	CO_2	*Neisseria meningitidis*, *Haemophilus*, *Streptococcus* y bacterias comunes, completos y/o con paredes defectuosas.
Caldo Tioglicolato con Indicador	35ºC	Común	Bacterias con requerimientos de atmósfera reducida y microaerófilos.
Medio de Loeffler	35ºC	Común	*Listeria*, *Moraxella*
Medio de Loeffler	Ambiente	Común	*Listeria*
Agar Columbia-Sangre	35ºC	CO_2	*Streptococcus* grupo B, *Listeria*

El medio de Loeffler nos servirá para obtener desarrollo de *Listeria* (a temperatura ambiente) las que desarrollan en formas perítricas muy móviles.

Incubando a 37ºC, permite el estudio del poder proteolítico de *Moraxella.*

El medio de Thayer-Martin, para recuperar *Neisseria meningitidis*, sólo es utilizado para el estudio del microorganismos desde sitios contaminados, como pueden ser pacientes portadores nasofaríngeos u otras muestras de piel (petequias).

En muestras de LCR, sangre o líquido pleural no es necesario agregar el suplemento inhibidor.

El medio bifásico de agar chocolate y caldo BHI con el agregado de 20% de sacarosa permite el desarrollo de bacterias con pared defectiva por tratamientos con antimicrobianos o formas L.

Los medios enriquecidos con el Suplemento Britalex® (para bacterias nutricionalmente exigentes, entre sus componentes se encuentran: vitaminas, NAD, glucosa y sales), son óptimos para la recuperación de meningococos y gonococos.

Se recomienda la siembra en medio bifásico de los LCR turbios en los que no se observen bacterias en el examen microscópico y en aquellos provenientes de pacientes tratados anteriormente con antimicrobianos.

En el LCR no se estudian de rutina anaerobios y ante la solicitud de investigarlos, se utilizarán medios de transporte adecuado, medio líquido o frasco de hemocultivo para anaerobios.

Es importante recordar que:

a. Existen meningitis bacterianas que en su fase inicial presentan líquidos claros (por ejemplo: meningitis fulminante).
b. Que la hipoglucorraquia no desciende exclusivamente por acción bacteriana, sino que en primer lugar la glucosa es utilizada por los PMN y que su valor debe ser relacionado con la glucemia.
c. Que además de *Mycobacterium tuberculosis* hay bacterias, como *Listeria monocytogenes*, que producen aumento de células mononucleares.

Lectura e interpretación de los cultivos:

Una vez producido el desarrollo bacteriano, luego de la incubación a 35ºC, observar detenidamente con lupa el tipo de colonia (morfología, disposición, consistencia, tamaño, crecimiento difuso, hemólisis, aspecto).

A partir de los distintos tipos de colonias en los diferentes medios de cultivo sembrados, realizar la coloración de Gram.

En todos los casos, al observar la placa de agar sangre, anotar tipo de hemólisis si hubiere.

Los microorganismos:

- cocos grampositivos, recuperados en caldos enriquecidos, placas de agar sangre y/o chocolate, incubado en atmósfera húmeda con 5 a 10% de CO_2 (método alternativo de jarra con vela y algodón humedecido).
- bacilos gramnegativos, recuperados de medios enriquecidos (como agar sangre, agar chocolate, entre otros), medios diferenciales (agar lactosados) y caldos.
- cocobacilos gramnegativos (morfología característica de *Haemophilus influenzae)*, recuperado de agar chocolate suplementado o no y de agar sangre con satelitismo, incubados en atmósfera húmeda con 5 a 10% de CO_2 (método alternativo de jarra con vela y algodón humedecido).
- diplococos arriñonados (morfología característica de *Neisseria meningitidis),* recuperados de agar chocolate suplementado o no, incubados en atmósfera húmeda con 5 a 10% de CO_2 (método alternativo de jarra con vela y algodón humedecido).

Se estudiarán según sus propiedades bioquímicas consultando la bibliografía correspondiente.

Cuadro 4. Criterios de LCR para el diagnóstico inicial de meningitis.

Criterio	Normal	Meningitis bacteriana	Meningitis tuberculosa	Meningitis viral Meningoencefalitis
Apariencia	Cristal de roca	Turbio	Cristal de roca o turbio	Cristal de roca
Leucocitos/mm^3	0–5	1000–10.000	25-500	5–1000
Neutrófilos (%)	0–15	>60	<50	<20
Glucosa (mg)	45–81	<45	<45	45–81
Relación glucosa LCR/ glucosa plasma	0,6	<0,3	<0,5	>0,5
Proteínas (g/l)	15–50	>50	>50	<100
Presión de apertura (mmH_2O)	<180	>180	>180	>180

Adaptado de Farreras-Rozman. Medicina Interna. 23° Ed. Harcourt-Elsevier. 2008.

Solamente para estudios virales o diagnósticos de biología molecular debe ser congelado el LCR.

Estudio de sensibilidad a los antimicrobianos: Son tratados en el **Capitulo 9.**

Pruebas rápidas

Estudios por técnicas inmunoserológicas (Búsqueda de antígenos bacterianos):

Las meningitis bacterianas son infecciones cuya evolución depende de la rapidez en instaurar el tratamiento antimicrobiano adecuado.

El diagnóstico microbiológico por cultivos es lento y, en algunos casos, debido a la aplicación de un tratamiento antimicrobiano previo a la toma de muestra, puede resultar negativo.

En el curso de una infección, ciertas bacterias liberan en los líquidos biológicos antígenos de estructura polisacárida que pueden detectarse por técnicas inmunológicas.

Las técnicas de detección de antígenos bacterianos utilizan los polisacáridos específicos para determinados serogrupos o serotipos como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* tipo b; *Neisseria meningitidis* grupo A, grupo B /*E.coli* K1, grupo C, grupo Y/W135 y *Streptococcus agalactiae*.

Las técnicas inmunológicas aplicables al diagnóstico rápido de meningitis bacteriana son diversas, variando cada una de ellas en la sensibilidad para detectar los antígenos:

- RIA (Radioinmunoanálisis): detecta antígenos presentes en líquidos biológicos en una concentración de 0,5 ng/ml.
- ELISA (Enzimoinmunoanálisis): detecta concentraciones de antígenos en el orden de los 1 ng/ml.
- CoA (Co-aglutinación): detecta concentraciones de antígenos en el orden de los 10 ng/ml.
- CIE (Contrainmunoelectroforesis): detecta concentraciones de antígenos en el orden de los 50 ng/ml.
- Látex (Aglutinación pasiva): detecta concentraciones de antígenos en el orden de los 50 ng/ml.
- FC (Fijación de complemento): detecta concentraciones de antígenos en el orden de los 500 ng/ml.

- IHP (Inhibición de la hemoaglutinación pasiva): detecta concentraciones de antígenos en el orden de los 500 ng/ml.
- DD (Doble difusión en gel): detecta concentraciones de antígenos en el orden de los 5000 ng/ml.

La más utilizada analizando sencillez, rapidez y sensibilidad es la aglutinación con partículas de látex.

Debemos recordar que estas técnicas, si bien son sumamente útiles en casos donde el contenido bacteriano en los fluidos biológicos es escaso, de modo que se dificulta la observación en la coloración de Gram y el aislamiento de los microorganismos o bien donde la viabilidad de los mismos haya sido afectada por tratamientos antimicrobianos previos, **nunca pueden reemplazar a la bacteriología convencional**.

En todos los casos, aunque se realice alguna técnica inmunoserológica para la búsqueda de antígenos bacterianos, los líquidos de punción deben ser sembrados y evaluados por el método microbiológico clásico.

Cualquiera sea la técnica inmunológica aplicada, deben siempre respetarse estrictamente las indicaciones dadas por el fabricante y nunca debemos extralimitarnos en la interpretación de los resultados, debiendo conocer para ello, previamente las limitaciones, ventajas y desventajas de cada técnica a utilizar.

Un resultado negativo no excluye meningitis bacteriana.

El resultado se altera por instauración de tratamiento antimicrobiano previo.

> Contrainmunoelectroforesis (CIE):

El principio básico del método implica la combinación de la electroforesis e inmunodifusión donde en un soporte de vidrio (portaobjeto) cubierto con gel de agarosa, antígeno y anticuerpo, sembrados en pocillos separados realizados en el gel, bajo la acción de un determinado campo eléctrico, migran simultáneamente en direcciones opuestas, obteniéndose la precipitación como resultante en un punto intermedio a sus orígenes.

Durante la electroforesis en medios con agarosa a pH 8, antígenos y anticuerpos se cargan negativamente.

Los antígenos migrarán hacia el ánodo, los anticuerpos que se cargan con mucha menor carga negativa y con un potencial eléctrico casi neutro, son "barridos" hacia el cátodo por la corriente de iones buffer o flujo endosmótico originado en el proceso.

La CIE es usada para detectar e identificar antígenos polisacáridos capsulares libres de células que están presentes como resultado de la infección en: LCR, suero u orina, líquido de punción pleural o pleuro-pulmonar, o bien en cultivos de sangre (hemocultivos).

La CIE es también usada para realizar la identificación serológica de cultivos de *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae* o *Streptococcus pneumoniae*.

> Instrucciones para la remisión de muestras:

- Se pueden recibir: LCR, líquido pleural, líquido pleuro-pulmonar, otros líquidos de punción u orina.
- El período de evolución no debe superar los siete días.
- Aceptar muestras con diagnóstico presuntivo de meningitis bacteriana e infección respiratoria aguda.
- Las muestras deben remitirse refrigeradas
- Solicitar siempre un resumen de la historia clínica del paciente. Recordar que es imprescindible conocer la edad del mismo.
- Recordar que durante el inicio del cuadro agudo (primeras 48 a 72 horas) la concentración de antígenos es elevada en los líquidos provenientes de las cavidades infectadas, comenzando la eliminación de los mismos por vía renal a partir del 4° día, por lo que se recomienda enviar además del líquido de punción, una muestra de orina (entre el 4° y 7° día).

> Muestras de orina

Enviar la muestra refrigerada.

En orinas turbias centrifugar y trabajar con el sobrenadante.

Paso 1: 5 ml de Orina +15 ml Etanol frío.

Paso 2: Colocar la mezcla en heladera a 4ºC –1 hora- o en el freezer – 15 min.

Paso 3: Luego de la refrigeración centrifugar a velocidades altas 10 o 15 min. (Utilizar preferentemente tubos fondo plano) y se formará un sedimento tipo pastilla en el fondo, volcar el sobrenadante.

Paso 4: Dejar escurrir el excedente alcohólico sobre un papel de filtro, con el tubo boca abajo.

Paso 5: Agregar 0,30 ml de solución fisiológica (SF).

Paso 6: Sembrar 10 µl en el pocillo correspondiente a la muestra.

> Muestras de líquido cefalorraquideo y/o pleural

Si son purulentos centrifugar (al sobrenadante diluirlo 1/20 con SF).

Sembrar varias diluciones del material (1/5; 1/10; 1/20).

Cuando existan doble halos (entrecruzamiento) calentar 5 min. BM ebullición.

Técnica:

1. Colocar sobre un portaobjetos desengrasado una o dos gotas de agarosa al 1%. Distribuir sobre toda la superficie con el dedo.
   Dejar secar 24 hs a 37ºC.
   Puede guardarse durante 2 meses a temperatura ambiente (le da al portaobjeto característica rugosa que evitará que el gel de agarosa se resbale en el vidrio).
2. Colocar una cubierta de 3 ml de agarosa al 1% en buffer de corrida. Dejar solidificar a temperatura ambiente en cámara húmeda.
3. Realizar la perforación dejando una distancia entre pocillos de 6 mm. Cada pocillo debe tener un diámetro de 3 mm.
4. La siembra se realiza con 10 µl de la muestra incógnita y 10 µl del antisuero específico.
   Al realizar la siembra colocar el portaobjeto en cámara húmeda.
   Tener cuidado al cargar los pocillos que no se formen burbujas de aire.
5. Ubicar el portaobjeto en la cuba de modo tal que el antígeno se encuentre del lado del cátodo y el pocillo del antisuero del lado del ánodo. Hacer contacto entre el buffer y el portaobjeto, usar para ello tiras de papel de filtro.
6. Encender la fuente de poder. La corrida se efectúa por 40 minutos a un voltaje de 100 o utilizando un amperaje de 2 a 3 por portaobjeto.

7. Cumplido el tiempo de corrida, desconectar la fuente de poder y observar con muy buena luz y una lupa la formación de bandas de precipitación entre los pocillos de antígenos y anticuerpos.

> Aglutinación con partículas de látex sensibilizadas:

Consiste en una técnica de aglutinación rápida realizada sobre tarjeta oscura para detectar antígenos.

Se utilizan partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos dirigidos contra *H. influenzae, S. pneumoniae, N. meningitidis* (diferentes serotipos y grupos obtenidos por inoculación de los mismos en conejo o bien de origen monoclonal) y *S. agalactiae.*

Esta técnica puede ser utilizada para detectar antígenos de naturaleza poliosídica en líquidos de punción (LCR, líquidos pulmonares o pleuro-pulmonares) y para la identificación de cepas aisladas a partir de productos patológicos.

Para la realización, respetar estrictamente las indicaciones del fabricante sobre todo en lo referido al tratamiento de los líquidos.

En general, es necesario utilizar el sobrenadante obtenido luego de la centrifugación del LCR u otro líquido a utilizar.

El sobrenadante se calienta a 100ºC durante 10 minutos a fin de permitir la liberación completa de los antígenos.

Luego de que se enfríe, se realizan las reacciones de aglutinación con los antisueros disponibles en el equipo comercial.

> Coaglutinación

La coaglutinación tiene los mismos fundamentos que la aglutinación con partículas de látex, solo que en este caso los anticuerpos dirigidos contra *H. influenzae, S. pneumoniae y N. meningitidis* (diferentes serotipos y grupos obtenidos por inoculación de los mismos en conejo o bien de origen monoclonal) están ligados a una cepa de *Staphylococcus aureus* rico en proteína A (cepa Cowan) con gran capacidad de ligar la porción Fc de la Inmunoglobulina G, dejando la porción Fab con habilidad para unirse a cualquier antígeno homólogo.

Los pasos de la técnica en general son similares a la anterior, pero siempre se debe atender a las indicaciones del fabricante.

Es obligatorio controlar la técnica con controles positivos y negativos.

Diagnóstico molecular

Las técnicas de diagnóstico molecular, se han desarrollado en las últimas décadas y son particularmente útiles en los casos de sospecha clínica de meningitis bacteriana y cultivos de LCR y sangre negativos.

Estas técnicas, permiten amplificar el ADN de cualquier bacteria lo cual es poco práctico, demoraría los resultados y elevaría los costos. Con lo cual debe primero existir una alta sospecha del agente causal de meningitis para dirigir la búsqueda.

Actualmente las distintas variantes de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), posibilitan la detección y amplificación de los patógenos meníngeos habituales.

Pueden elegirse pruebas con cebadores ("primers") que corresponden a regiones específicas de cada microorganismo o seleccionar regiones presentes en todas las bacterias (16S rARN y 23S rARN).

Estas pruebas tienen una sensibilidad y especificidad próximas a 100%, son capaces de detectar la etiología en muestras con 5 UFC/ml.

La PCR aplicada al diagnóstico de sospecha clínica de meningitis supera en sensibilidad y especificidad a la bacteriología convencional, siendo especialmente útil en pacientes tratados.

Los métodos moleculares no sustituyen a los cultivos que permiten investigar la sensibilidad a antimicrobianos.

A través de las pruebas específicas, se obtiene la identificación del microorganismo y mediante las que utilizan segmentos repetidos de ADN, se puede excluir el diagnóstico de meningitis bacteriana.

Se puede orientar el diagnóstico molecular desde dos puntos de vista:

1. Como una prueba de diagnóstico más ante la urgencia, sobre todo, para el estudio de casos sospechosos de meningitis meningocócica o neumocócica con cultivos negativos. El estudio se realiza sobre muestras clínicas.
2. Como herramienta para estudios epidemiológicos (de brote, diseminación de cepas virulentas, confirmación y propagación de mecanismos de resistencia). Las técnicas requieren cepa aislada de materiales clínicos.

Cuando se recurre a técnicas moleculares para diagnóstico, para *Neisseria meningitidis* se utiliza la amplificación del gen *ctr* de la cápsula (menos afectado por las especies contaminantes) y en caso de positividad, la posterior amplificación del gen *srd* para identificar serogrupo. En el caso de neumococo se amplía el gen de la neumolisina.

En los últimos años, se están aplicando técnicas más rápidas de PCR en tiempo real (RT-PCR) y de PCR multiplex que permiten amplificar las tres especies más comunes en una sola prueba. Muestran excelente sensibilidad (100%) y valor predictivo negativo mayor a 99%.

Cuando se utilizan técnicas moleculares para estudios epidemiológicos, la técnica "gold estándar" es la electroforesis en campo pulsado (PFGE), técnica muy sensible a mutaciones producidas en el genoma bacteriano.

Otras técnicas son las de tipado molecular por Multilocus Sequence Type (MLST) que permite el trazar la dispersión exacta de líneas clonales, asociadas a altos niveles de virulencia, y el epidemic type (ET) que posibilita el trazado preciso del desplazamiento geográfico y temporal de los aislados.

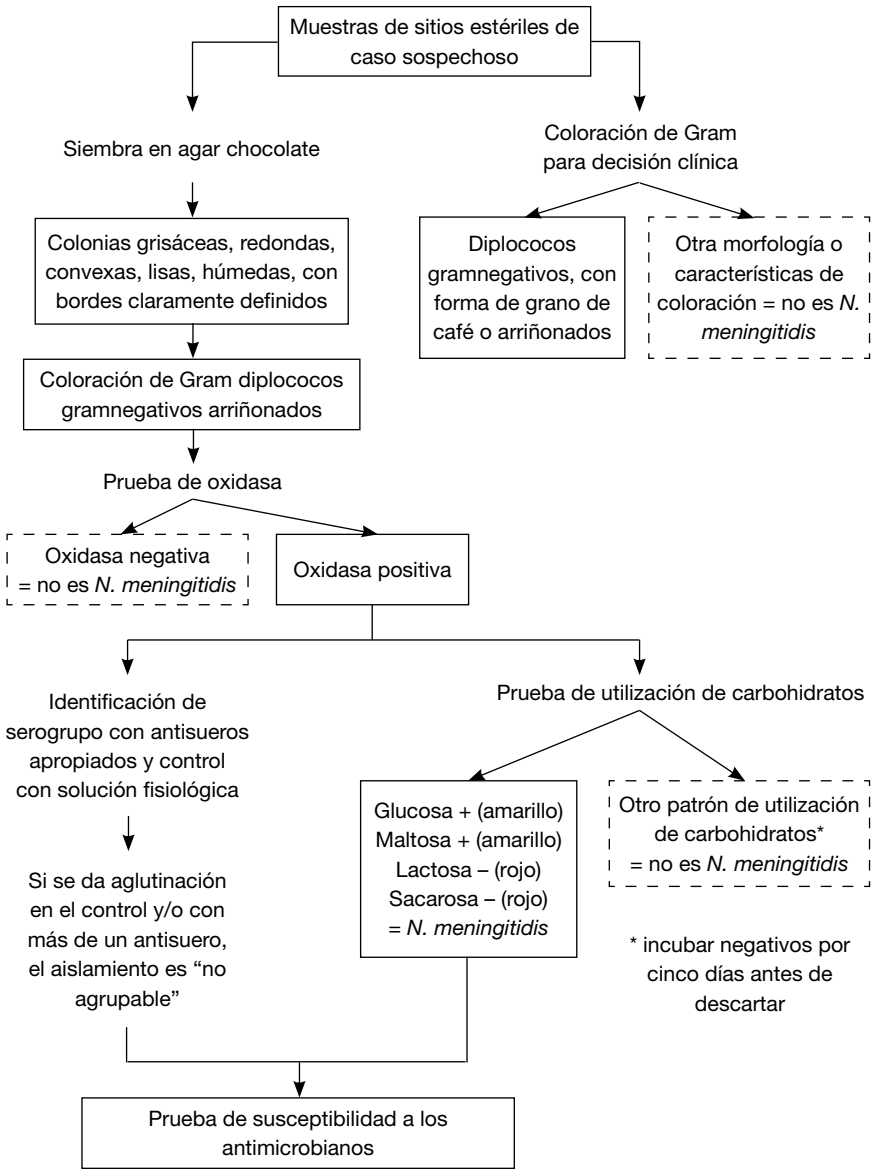
En el caso de meningococo, estas técnicas permiten tanto el estudio de brotes internos como diseminación global de cepas hipervirulentas.

Para neumococo, se pueden estudiar por MLST clones asociados a enfermedad invasiva grave y sobre todo aquellos asociados con resistencia a penicilina.

En conclusión, se estima que la aplicación de técnicas de PCR a muestras de LCR de pacientes con sospecha de meningitis bacteriana, es una estrategia promisoria como diagnóstico etiológico y en el futuro puede garantizar su utilidad en los casos en que la coloración de Gram y el cultivo resulten negativos.

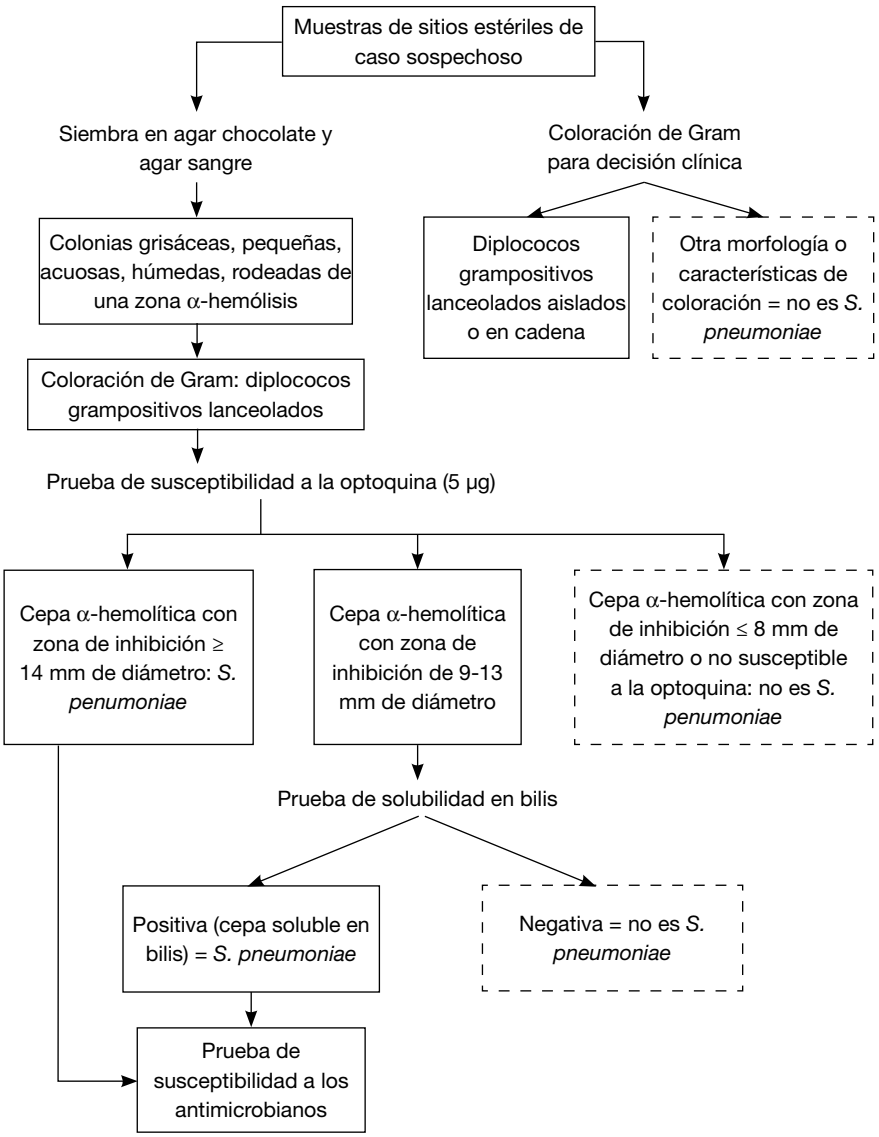
Las técnicas de PFGE, MLST y ET actualmente son utilizadas para el estudio de brotes, diseminación de clones virulentos y propagación de mecanismos de resistencia a antibióticos.

Diagrama de flujo de las pruebas para la identificación de aislamientos de *Neisseria meningitidis.*



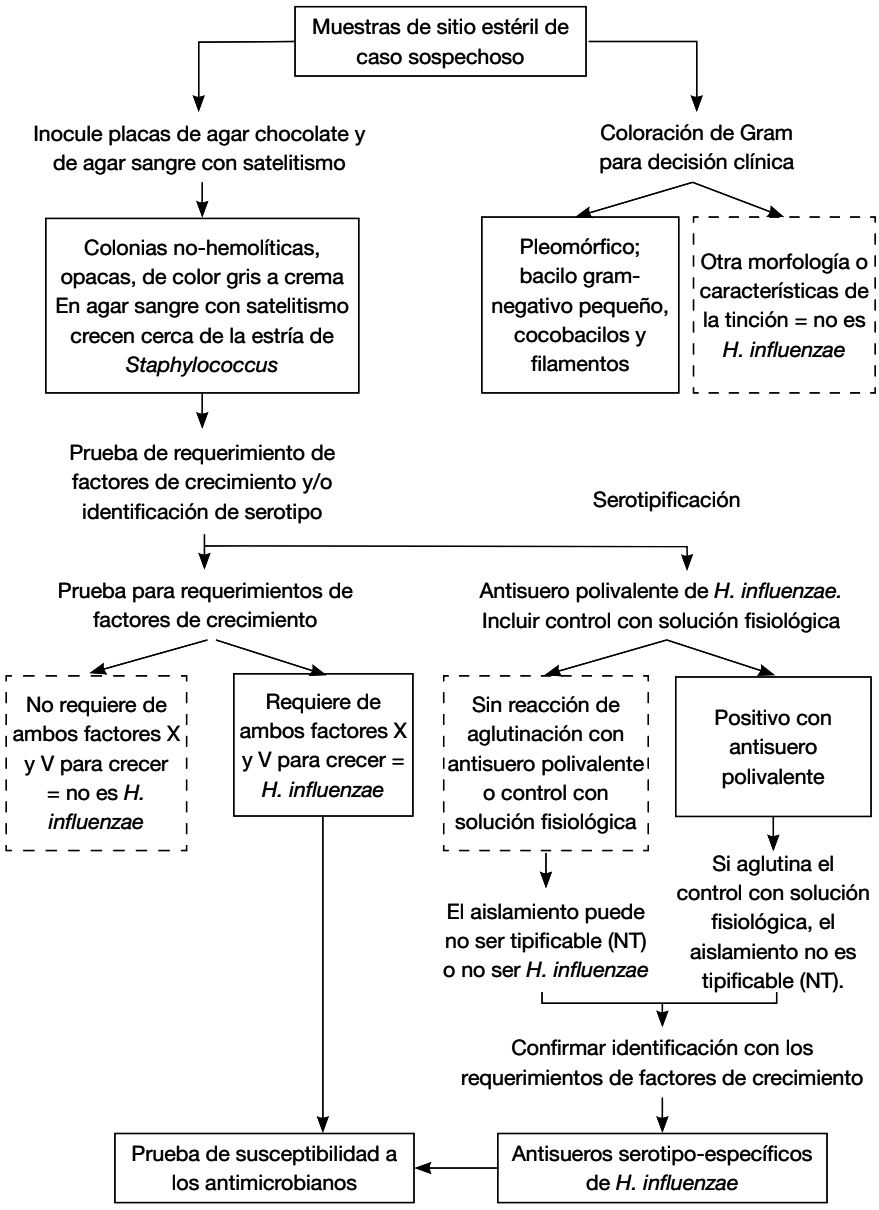
(Adaptado de Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo-WHO/CDC/CSR/RMD/2003.6).

Diagrama de flujo de las pruebas para la identificación de aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*



(Adaptado de Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo-WHO/CDC/CSR/RMD/2003.6).

Diagrama de flujo de las pruebas para la identificación de aislamientos de *Haemophilus influenzae*



(Adaptado de Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo-WHO/CDC/CSR/RMD/2003.6).

Para concluir el tratamiento de esta sección, dedicada al diagnóstico bacteriológico de meningitis aguda, resulta importante determinar la existencia de pruebas obligatorias y optativas durante su procesamiento:

Pruebas de laboratorio obligatorias:

- Examen microscópico directo (tinción de Gram, baciloscopía, May Grunwald Giemsa para observación de células y microorganismos).
- Cultivo en medios apropiados para aislamiento e identificación de los patógenos probables (*Neisseria meningitidis*, *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae, Listeria monocytogenes*, *S. agalactiae,* enterobacterias, *Cryptococcus* spp. y otras levaduras) y de cualquier otro patógeno.
- Estudio de sensibilidad a antimicrobianos.

> Pruebas de laboratorio optativas:

- Detección de antígenos bacterianos de *N. meningititis*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae* por técnicas rápidas (principalmente por aglutinación con partículas de látex).
- Tinta china para visualización de la cápsula de *Cryptococcus* spp.
- Pruebas de sensibilidad directa a antimicrobianos en LCR mediante E-test ante una visualización positiva en la tinción de Gram.
- Detección de antígenos víricos mediante PCR ante sospecha clínica.
- Técnicas moleculares para el diagnóstico de meningitis bacteriana.
- Cultivo de micobacterias si existe sospecha clínica.

Procedimientos de diagnóstico microbiológico de hemocultivos

Si bien la muestra de hemocultivo no acompaña únicamente a la muestra de LCR, se decidió abordar el tema en este capítulo por su importancia en el diagnóstico de meningitis bacteriana.

Indicaciones de los hemocultivos

La mortalidad de las bacteriemias o fungemias oscila entre el 20% y el 50%, lo que determina que el laboratorio de microbiología precise de téc-

nicas que aseguren se detección en el menor tiempo posible para favorecer su diagnóstico y mejorar el pronóstico de estas infecciones.

Se define como bacteriemia a la presencia de bacterias en la sangre que se evidencian por su aislamiento en los hemocultivos (cultivo de sangre en medios apropiados). En tanto que la fungemia alude a la presencia de hongos en la sangre y su recuperación.

Tanto bacteriemias como fungemias son complicaciones graves de infecciones bacterianas o fúngicas respectivamente. Se producen cuando los microorganismos invaden el torrente sanguíneo y se multiplican a una velocidad mayor que supera la capacidad del sistema reticuloendotelial para eliminarlos.

En general, los hemocultivos deben realizarse antes de iniciar la terapia antimicrobiana y siempre que exista sospecha clínica de sepsis, meningitis, osteomielitis, pielonefritis, infección abdominal, artritis, infecciones graves de la piel y tejidos blandos, neumonía, endocarditis y fiebre sin foco evidente.

Los signos que orientan esta sospecha incluyen fiebre, hipotermia o disminución súbita de la vitalidad (neonatos, ancianos), escalofríos, leucocitosis o granulocitopenia, deterioro uni o multiorgánico, shock, compromiso hemodinámico y sus combinaciones.

Las muestras para hemocultivos deben ir acompañadas por otras que deriven de los focos sospechosos de producción de la invasión del torrente sanguíneo (orina, líquido cefalorraquídeo, muestras del tracto respiratorio inferior, líquidos de punción de diversa localización –articular, osteomielitis, abscesos).

El diagnóstico definitivo se realiza con el aislamiento y la identificación de los microorganismos y la determinación de su sensibilidad a antimicrobianos para determinar continuar con la terapia empírica inicial o modificarla.

Obtención de la muestra de sangre

Como regla general se recomienda la extracción de sangre para hemocultivos lo más próxima a los picos febriles, antes de iniciar tratamiento antimicrobiano y si éste se encuentra instaurado, tomar la muestra en el "valle" (justo antes de la próxima dosis).

Es de esperar que ante la presencia de fiebre intermitente (bacteriemia intermitente o bacteriemia transitoria), la sangre para cultivo debería obte-

nerse idealmente durante la hora previa al proceso febril y al pico de temperatura esperado, dado que existe habitualmente un retraso de aproximadamente una hora entre el paso de bacterias al torrente sanguíneo y el comienzo de la fiebre, por lo que la sangre puede estar estéril en el momento en que la fiebre comienza. Habitualmente no obstante, los hemocultivos se obtienen luego del inicio de la fiebre o escalofríos.

Si la bacteriemia (endocarditis, infecciones intravasculares, etc.) es continua, el momento de extracción de la muestra de sangre es indiferente.

La muestra de sangre para hemocultivos se toma generalmente de una vena ya que la extracción a partir de una arteria no ha demostrado mayor ventaja y el procedimiento tiene sus riesgos.

La extracción no debe realizarse a través de catéteres intravenosos o intraarteriales, excepto en los casos de sospecha de bacteriemia asociada a catéter.

Cada muestra de sangre se obtendrá por venopunción de sitios diferentes y respetando, de preferencia, un período de tiempo no menor a 30 minutos entre cada toma.

> Asepsia de la piel

La contaminación con la población microbiana habitualmente presente en la piel durante la extracción, es el principal problema para la interpretación correcta de los hemocultivos.

Si se utiliza una técnica de asepsia correcta, el número de hemocultivos contaminados no debería exceder el 3% para el mismo operador.

Generalmente, la presencia de SCN (estafilococos coagulasa negativos), *Bacillus* spp., *Propionibacterium acnes, Corynebacterium* spp. y otros microorganismos que forman parte de la población microbiana habitual de la piel se considera una contaminación, siempre que su aislamiento no se reitere en más de una muestra por paciente.

Para la toma de la muestra es de importancia:

- El uso de guantes estériles.
- Cerrar puertas y ventanas para evitar corrientes de aire.
- En la habitación deben encontrarse solamente el paciente y operador.
- Evitar el diálogo en el momento preciso de realizar la asepsia de la piel, seguida de venopunción y la inoculación de los frascos de hemocultivo.

La sangre puede extraerse con una jeringa y aguja estériles, o mediante un equipo de transferencia o una aguja con doble punta que desemboque en un tubo de recolección de sangre al vacío, conteniendo anticoagulante, polianetolsulfonato de sodio (PSS) o directamente en frascos con medio de cultivo, al vacío.

Primero debe palparse la zona, identificar y seleccionar la vena para la punción y luego realizar la limpieza de la zona. Para ello, debe frotarse en forma concéntrica, comenzando por el centro, con una solución de povidona-yodo al 10% (yodo disponible 1%) y posteriormente limpiar con alcohol isopropílico o etílico al 70%, cubriendo un área circular de 2-4 cm de diámetro.

En pacientes alérgicos a los compuestos yodados se deben realizar dos limpiezas con alcohol isopropílico y sólo en su defecto etanol 70%.

Es preferible y a la vez conveniente emplear torundas o hisopos estériles preparados individualmente.

Para una mayor eficacia, debe dejarse secar el desinfectante antes de extraer la sangre.

> Extracción de la muestra de sangre

Antes realizar la extracción de la sangre, los tapones de los frascos de hemocultivo se deben limpiar con un antiséptico que se dejará secar para evitar su entrada en el interior del frasco al inocular la sangre, ya que aún en pequeñas cantidades podría inhibir el crecimiento bacteriano.

A continuación se extraerá la sangre sin utilizar anticoagulante.

Los frascos de hemocultivo deben inocularse rápidamente para evitar la coagulación de la sangre en la jeringa, atravesando el tapón con la aguja en posición vertical, evitando la entrada de aire.

Una vez inoculados, los frascos se deben invertir varias veces, sin producir espuma, para mezclar la sangre y el medio de cultivo.

> Número e intervalo de las extracciones

El número de extracciones considerado óptimo para la documentación de un episodio de bacteriemia es de 2 a 3, extrayendo en cada episodio 10 ml de sangre inoculada en cada frasco conteniendo 100 ml de medio de cultivo, utilizando siempre lugares diferentes de venopunción a fin de evitar

contaminaciones y molestias al paciente, ya que permite detectar más del 95% de las bacteriemias.

Si se siembran diferentes frascos con la sangre procedente de una sola punción venosa, el conjunto debe considerarse como un hemocultivo único, por lo cual este procedimiento debe evitarse porque disminuye la posibilidad diagnóstica.

Como se comentó, la extracción se realiza lo antes posible después de la aparición de los síntomas (fiebre, escalofríos, etc.) teniendo en cuenta que las bacterias son eliminadas rápidamente de la sangre por las células del sistema reticuloendotelial.

Los hemocultivos pueden efectuarse con intervalos de aproximadamente una hora, salvo en situaciones clínicamente urgentes, en las que sea necesario reducir los intervalos a minutos de modo de obtener sangre antes de iniciar la terapia antimicrobiana. En general se toman dos o tres muestras con intervalos de 15 a 30 minutos, ante urgencia, es posible tomar dos muestras simultáneamente de venas distintas.

Siempre que sea posible, las extracciones deben realizarse antes de la administración de antimicrobianos.

> Volumen de sangre a cultivar

De todas las variables que influyen en el aislamiento de un microorganismo en un hemocultivo, el volumen de sangre cultivada es lo más importante, debido al bajo número de microorganismos presentes en la mayoría de las bacteriemias, sobre todo en el paciente adulto, por ello se recomienda la extracción de volúmenes superiores a 10 ml en frascos de 100 ml de medio como se comentó anteriormente, manteniendo la proporción sangre:medio no menor del 10 %.

El volumen de sangre cultivada varía según se trate de niños o adultos.

Esta dilución de la sangre en el medio de cultivo es necesaria para neutralizar sus propiedades bactericidas. En los pacientes en tratamiento con antimicrobianos esta dilución permite, además, conseguir que la presencia de éstos se reduzca hasta alcanzar concentraciones subinhibitorias.

> Transporte del hemocultivo al laboratorio

Cada frasco de hemocultivo con la sangre inoculada debe ser debidamente identificado con:

- Nombre y apellido del paciente.
- Fecha y hora de extracción de cada muestra.
- Orden en que fueron extraídas las muestras.
- Quien los solicita (servicio, planta, número de cama, nombre del médico).
- Temperatura axilar y/o rectal.
- Diagnóstico del paciente.
- Tratamiento antimicrobiano que está recibiendo.

Los frascos, con su debida identificación, deben transportarse al laboratorio inmediatamente. En caso de no poder colocar los frascos inmediatamente en estufa a 35ºC, mantenerlos a temperatura ambiente hasta su posterior incubación.

Los frascos de hemocultivos sembrados con sangre, u otro líquido biológico, nunca deben ser refrigerados.

> Procesamiento de los hemocultivos e Interpretación de los resultados

Existen métodos manuales y métodos automatizados para el procesamiento de los hemocultivos para el procesamiento de los hemocultivos.

Métodos manuales

Método convencional (Flujograma 2)

Es un método técnicamente simple que se basa en la observación macroscópica de los signos de desarrollo bacteriano en los frascos con medio de cultivo líquido en los que se ha inoculado la sangre del paciente.

Se usan diversos medios de cultivo, desde caldo nutritivo glucosado hasta medios más complejos para permitir la recuperación de bacterias más exigentes.

Existen medios comerciales que permiten la recuperación de microorganismos aerobios, anaerobios, CO_2 dependientes y variantes bacterianas.

La mayoría de los medios de cultivo preparados comercialmente están adicionados con polianetol sulfonato de sodio (PSS), un anticoagulante polianiónico que inhibe la actividad del complemento y la lisozima, interfiere en la fagocitosis e inactiva las concentraciones de aminoglucósidos clínicamente alcanzables.

Sin embargo, el PSS inhibe el desarrollo de algunas cepas de *Neisseria meningitidis* y *N. gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis* y *Peptoestreptococcus anaerobius.* Este efecto inhibitorio puede neutralizarse adicionando al medio 1,2% de gelatina, no obstante ante la sospecha de gonococcemia o meningococcemia, debe inocularse la sangre del paciente en medios sin PSS.

El medio de cultivo se embotella al vacío con una atmósfera que contiene cantidades variables de CO_2.

El potencial de óxido-reducción del medio, si no se ventila, es lo suficientemente bajo como para permitir el crecimiento de bacterias anaerobias.

Siempre es conveniente ventilar uno de los frascos después de la inoculación, por medio de una aguja estéril, obturada con algodón estéril, que atraviese el tapón de goma, a fin de permitir la entrada de oxígeno y crear una atmósfera aerobia, que permitirá sobre todo el desarrollo de levaduras.

Los frascos se incuban a 35ºC en estufa.

La mayoría de los microorganismos responsables de bacteriemia se aíslan entre las 18 y 72 horas siguientes del inicio de la incubación de los hemocultivos.

Se aíslan durante la primera semana, más del 95% de los microorganismos implicados, por lo tanto la incubación se mantiene al menos durante 7 días.

Existen, no obstante, algunos patógenos y situaciones en los que se precisa más tiempo para su crecimiento (hongos, microorganismos del género *Brucella* y algunos microorganismos causantes de endocarditis (*Cardiobacterium* spp., *Eikenella* spp., etc) por lo que, ante la sospecha de cualquiera de estas circunstancias, se prolonga la incubación hasta 4 semanas.

Los frascos se observan diariamente para detectar signos visibles de crecimiento bacteriano como: turbidez del medio, hemólisis de hematíes, producción de gas o formación de colonias en el fondo del frasco.

Como existen causas ajenas al crecimiento bacteriano que pueden enturbiar el medio o hemolizar los hematíes, así como microorganismos que pueden crecer sin producir ningún signo macroscópico de crecimiento, la visualización macroscópica se debe complementar con el examen microscópico.

En las primeras 18-24 horas de cultivo, existan o no signos de desarrollo bacteriano, se debe realizar un primer subcultivo ciego. Este procedimiento implica tomar una alícuota del frasco de hemocultivo por punción con aguja y jeringa estéril, previa desinfección del tapón con solución de povidona-yodo al 10% o alcohol isopropílico o etílico 70%.

La alícuota obtenida se pasa a un tubo estéril del cual se realiza extendido para coloración de Gram y microscopía, y subcultivo en medio sólido (recomendado usualmente: placa de agar chocolate).

El informe del primer control debe incluir, inicialmente a las 24 hs, la observación microscópica y al día siguiente (48 hs), el informe del desarrollo en placa (sin desarrollo o recuperación de colonias que deberán evaluarse para su correcta interpretación e informe).

En niños, donde las bacteriemias son con alto inóculo bacteriano, este primer subcultivo debe realizarse luego de 6-8 horas de incubación de los frascos.

No se recomienda el examen microscópico diario, con coloración de Gram, de los hemocultivos sin signos de crecimiento porque aumenta la posibilidad de contaminación de la muestra y porque ha demostrado ser de poco valor.

A los 7 días de incubación, antes de desechar los frascos como negativos, se debe realizar una última observación microscópica.

De observarse algún signo visible de desarrollo bacteriano, en cualquier etapa del período de incubación, una alícuota del medio líquido se debe subcultivar en medio sólido apropiado a fin de recuperar los microorganismos para su identificación y estudio de sensibilidad.

Si se observa en la coloración de Gram, un solo morfotipo, es posible realizar pruebas de identificación y el estudio de sensibilidad preliminares a partir de la alícuota obtenida directamente del frasco de cultivo.

Estos resultados tienen un gran valor en el manejo inicial del paciente con bacteriemia.

Cuando se trata de bacteriemias monomicrobianas (la mayoría de las veces), dichas pruebas de identificación suelen dar resultados comparables con los que aporta la identificación definitiva en más del 90% de los estudios.

El antibiograma preliminar permite disponer lo más rápido posible la sensibilidad del microorganismo.

Sin embargo, al no poder ajustar el inóculo según las normas establecidas, dicha sensibilidad se debe considerar presuntiva y debe ser confirmada con la realización del antibiograma a partir del microorganismo aislado.

La correlación de este procedimiento con los resultados del antibiograma definitivo realizados a partir de colonias aisladas oscila entre 87 y 99,3% en diversos estudios.

El hallazgo de un hemocultivo positivo puede ser crítico por lo que el resultado obtenido de la tinción de Gram debe informarse inmediatamente por vía telefónica al médico responsable del enfermo y dejar registrado el día, la hora y el nombre de la persona que recibe el informe. En dicho informe se especificará la morfología y tinción de los microorganismos y el número de hemocultivos en los que se observan con referencia al total de los extraídos.

Método Bifásico descrito por Castañeda

La muestra de sangre se siembra en un frasco con medio bifásico compuesto de una fase sólida y otra líquida. La fase sólida está compuesta por Agar Tripticasa de Soya y Agar-Agar. La fase líquida tiene caldo Tripticasa de Soya adicionado de PSS.

Al inclinar el frasco, el medio líquido cubre totalmente el medio sólido, realizando un subcultivo sin necesidad de abrir la botella.

Con este procedimiento la detección de bacterias y hongos mejora y es más precoz que con el método convencional, pero tiene el inconveniente de no permitir un adecuado aislamiento de anaerobios, ya que ha de abrirse la botella para la recolección de los microorganismos que han desarrollado en la fase sólida.

Por ello, es necesario incluir un frasco de hemocultivo líquido que garantice el aislamiento de anaerobios.

Método de Lisis-filtración

En este método, se lisan las células sanguíneas y luego se procede a filtrar la sangre para retener las bacterias.

El filtro utilizado, o fragmentos del mismo, se siembra en distintos medios de cultivo.

Este método, de buen rendimiento, requiere un elevado tiempo de procesamiento en el laboratorio por lo que no se utiliza rutinariamente.

Método de Lisis-centrifugación

El método de lisis-centrifugación es la base del sistema Isolator.

Consiste en un tubo que contiene saponina como agente lisante, polipropilenglicol como agente antiespumante, PSS y EDTA como anticoagulantes y un líquido fluoroquímico inerte.

La muestra de sangre se mezcla con el contenido del tubo para lisar las células sanguíneas.

A continuación, para separar los microorganismos y los elementos sanguíneos, se centrifuga el tubo a 3.000 rpm durante 30 minutos.

El sobrenadante se desecha y se siembra el sedimento en distintos medios de cultivo.

Este método detecta con mayor rapidez la presencia de levaduras que cualquier otro sistema.

Sus mayores inconvenientes derivan de la necesidad de procesar cada muestra individualmente y dentro de los 30 minutos posteriores a su extracción, su laborioso manejo, la alta incidencia de contaminaciones que genera y su costo.

Método Manométrico

El método manométrico, empleado por el sistema Signal, consta de una botella con caldo de cultivo a la que, una vez que se inocula la sangre, se le acopla una pequeña cámara con una aguja que llega hasta el fondo del medio líquido.

La producción de gas durante el crecimiento bacteriano provoca un aumento de la presión dentro de la botella que desplaza el medio de cul-

tivo líquido a través de la aguja introduciéndose dentro de la mencionada cámara.

La presencia de medio de cultivo en la cámara indica crecimiento bacteriano.

Su principal inconveniente son los falsos positivos que produce.

Métodos automatizados

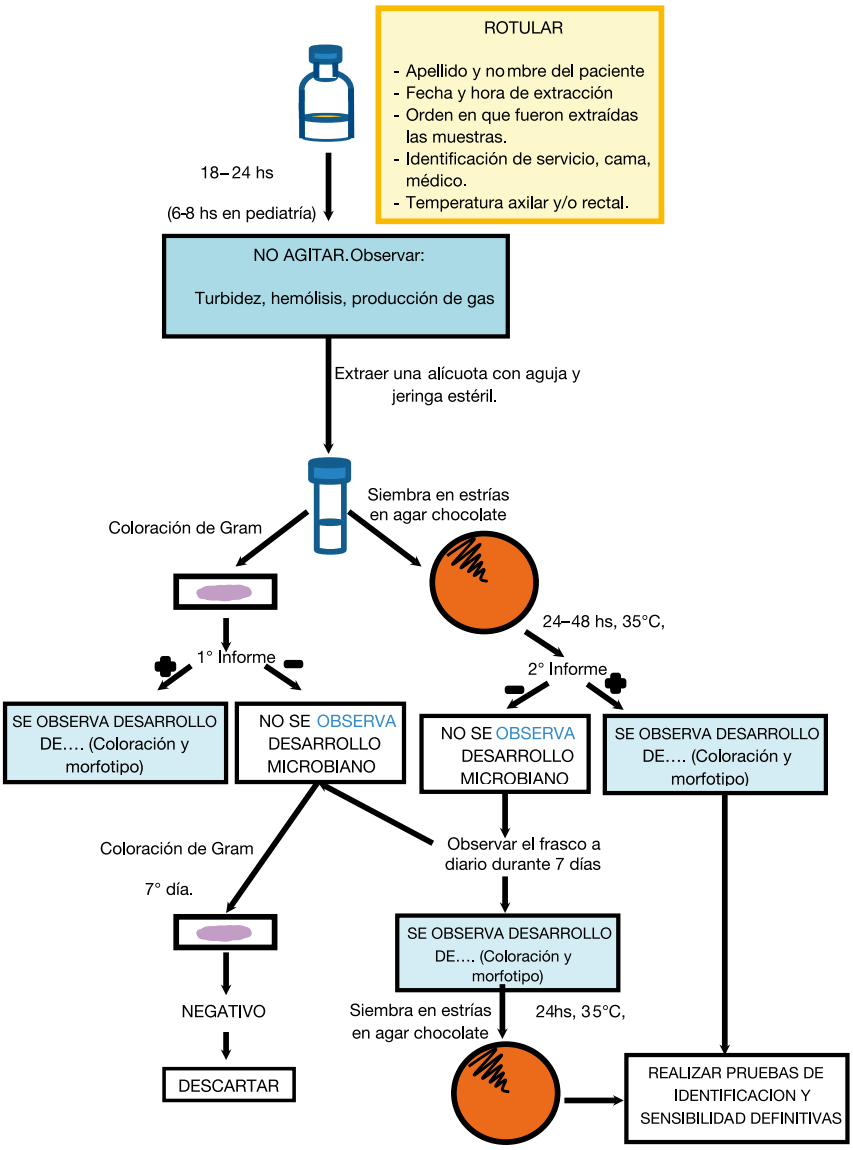
Existen diversos métodos: radiométricos y no radiométricos, y sistemas automáticos de monitorización continúa.

- El Bactec 460, radiométrico, fue el primer sistema comercial de hemocultivos automático. Utiliza substratos marcados con ^{14}C que al ser metabolizado por los microorganismos libera $^{14}CO_2$ al medio, que difunde a la atmósfera del frasco. En esta atmósfera se mide periódicamente el nivel de $^{14}CO_2$ y se expresa como un índice de crecimiento cuando se compara con los niveles de CO_2 en frascos de control.
- Los sistemas Bactec NR-660y NR-730, no radiométricos, detectan el CO_2 por espectrometría de infrarrojos.

Los sistemas automáticos de monitorización continúa se basan en la detección de la producción de CO_2 por los microorganismos. Los datos obtenidos en cada lectura se transmiten a una computadora que analiza cuándo se produce crecimiento bacteriano, a la vez que minimiza el número de falsos positivos y falsos negativos.

- El Bactec-9240 es un sistema totalmente automático, no invasor, donde el CO_2 producido por el metabolismo bacteriano reacciona con un material fluorescente situado en el fondo del frasco del hemocultivo, lo que modula la cantidad de luz que es absorbida por un sensor. Los fotosensores miden el nivel de fluorescencia, que se corresponde con la cantidad de CO_2 producida por el microorganismo.
- El BacT/Alert detecta el aumento y/o nivel total de CO_2 producido por el crecimiento microbiano utilizando un sensor colorimétrico interno pegado al fondo de los frascos. A medida que cambia el color del sensor, la cantidad de luz reflejada se incrementa y es cuantificada como un aumento del voltaje.
- El sistema Vital difiere de los anteriores en que incorpora un indicador fluorescente en el medio de cultivo. Como consecuencia del metabolismo microbiano se producen cambios en el pH, en el potencial

redox o en el nivel de CO_2 que provocan una disminución de la fluorescencia del indicador.



Flujograma 2. Procesamiento de hemocultivos en el laboratorio de bacteriología

Recomendaciones para el diagnóstico de bacteriemias
Tener en cuenta que:

- Un hemocultivo puede ser positivo sin que ello represente un episodio verdadero de bacteriemia, ya que puede haberse contaminado la muestra durante la extracción o su procesamiento.
- La distinción entre la verdadera bacteriemia y la falsa bacteriemia por contaminación es un aspecto trascendental para el paciente.
- Uno de los datos orientativos más importante lo constituye el tipo de microorganismos aislados.
- *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y otras enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pneumoniae* son responsables de bacteriemias verdaderas en más del 90% de los casos. Mientras que, los microorganismos que forman parte de la población microbiana habitual, como los estafilococos coagulasa negativos, *Streptococcus* del grupo *viridans, Corynebacterium* spp., *Propionibacterium acnes, Bacillus* spp. y algunas especies de *Clostridium,* en conjunto, suponen menos del 5% de las bacteriemias verdaderas.
- Es por ello que es preciso recurrir al número de hemocultivos en que se reitera el aislado y en este sentido, sin que el dato sea definitivo, es indudable que la reiteración de idéntica bacteria en más de una extracción, aumenta la probabilidad de que se trate de una bacteriemia verdadera.
- En el caso de la endocarditis, la bacteriemia es continua y si un cultivo es positivo todos deberían serlo también.
- También es de ayuda para la interpretación, la existencia de cuerpos extraños o focos infecciosos de los que se haya aislado idéntico microorganismo que en la sangre.
- Para establecer con seguridad el significado de los cultivos positivos, es necesario que el microbiólogo valore conjuntamente con el clínico los resultados obtenidos.
- El aislamiento del agente responsable, en muchos casos, orienta al diagnóstico de patologías definidas, como: endocarditis (*Streptococcus* del grupo *viridans*), neoplasia de colon *(Streptococcus bovis)* e incluso pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en los que pueden aislarse *Salmonella* spp*.,* y enterococo.

Bibliografía consultada

Adriana Efron y col. Vigilancia de Serogrupos de Neisseria meningitides en Argentina en el periodo 2006-2011, AAM Boletín 197. JULIO-SEP 2012.

Akhvlediani T, Bautista CT, Shakarishvili R, Tsertsvadze T, Imnadze P, Tatishvili N, et al. Etiologic agents of central nervous system infections among febrile hospitalized patients in the country of Georgia. PLoS One. 2014; 9(11): e111393. doi:10.1371/journal.pone.0111393.

Bahr NC, Boulware DR. Methods of rapid diagnosis for the etiology of meningitis in adults. *Biomark Med*. 2014; 8(9): 1085-103. doi:10.2217/bmm.14.67.

Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D. Epidemiology, Diagnosis, and Antimicrobial Treatment of Acute Bacterial Meningitis. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23(3): 467-92. doi:10.1128/CMR.00070-09.

Cabellos C, E. Navas E, Martínez Lacasa J, Gatell J, Fernández-Viladrich P. Infecciones del Sistema Nervioso Central. Procedimientos Clínicos. SEIMC. 2014.

Chiávetta L, Chávez E, Ruzic A, Mollerach M, Regueira M. Vigilancia de *Neisseria meningitidis* en Argentina, 1993-2005: distribución de serogrupos, serotipos y serosubtipos causantes de enfermedad invasiva. *Rev Argent Microbiol* 39(1): 21-7. 2007.

de Gans J, van de Beek D, European Dexamethasone in Adulthood Bacterial Meningitis Study Investigators. Desamethasone in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 347(20): 1549-1556. 2002

Farreras-Rozman. *Medicina Interna*. 23° Ed. Harcourt-Elsevier. 2008.

Greenwood B M. Corticosteroids for acute bacterial meningitis. *N Engl J Med* 357(24): 2507-2509. 200

Hunt R (Ed). Microbiology and Immunology on-line. University of South California. School of Medicine. En: http://pathmicro.med.sc.edu

Koneman EW, Winn WC (h.), Allen SD, Janda WM, Procop GW, Schreckenberg PC. *Diagnóstico Microbiológico.* Texto y Atlas en color. 6th Edición. Ed. Médica Panamericana. 2008.

Lepe Jiménez JA, Alcalá Galicia B, Vázquez Moreno JA. *Diagnóstico microbiológico de las meningitis bacterianas en Pediatría*. Vox Pediatrica. 2004; 2(1): 52-53.

María Carolina Davenport, María de la Paz Del Valle. Meningitis bacteriana: Factores de riesgo para el desarrollo de complicaciones

agudas. *Arch. argent. pediatr*. v. 105 n. 5 Buenos Aires sep. /oct. 2007

Mayoral C, Baroni M R, Giani R, Virgolini S, Zurbriggen L, Regueira M. Distribución de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* aislados de infecciones invasoras en el Hospital de Niños de Santa Fe. *Rev Argent Microbiol* 40(1): 13-16. 2008

Parra M, *et al*. Consenso de la Sociedad Latinoamericana de Infectología Pediátrica (SLIPE) sobre Epidemiología del Neumococo en Latinoamérica. *Rev Enf Inf Ped*. 2012.

Swartz M N. Bacterial Meningitis- aview of the past 90 years. *N Engl J Med* 351(18): 1826-1828. 2004

Todar's Online Textbook of Bacteriology. En: http: //www. textbookofbacteriology.net

Tunkel A R, Hartman B J, Kaplan S L, Kaufman B A, Roos K L, Scheld W M, Whitley RJ. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis* 39(9): 1267-84. 2004.

van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, Weisfelt M, Reitsma J B, Vermeulen M. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 351(18): 1849-1859. 2004.

van de Beek D, de Gans J, Tunkel A R, Wijdicks E F. Community-acquired bacterial meningitis in adults. *N Engl J Med* 354(1): 44-53. 2006.

Vergara Marta y cols. *Las Infecciones Bacterianas y el Laboratorio de Bacteriología*. Posadas. EdUNaM. 2009. 141-5.

Vergara M, Quiroga M, Pegels E, Oviedo P, Laczeski, M. *Guías para el Diagnóstico en Bacteriología Clínica.* Cátedra de Bacteriología. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Posadas. EdUNaM. 2009.

Wang Y, Guo G, Wang H, Yang X, Shao F, Yang C, *et al.* Comparative study of bacteriological culture and real-time fluorescence quantitative PCR (RT-PCR) and multiplex PCR-based reverse line blot (mPCR/RLB) hybridization assay in the diagnosis of bacterial neonatal meningitis. *BMC Pediatr.* 2014; 14: 224. doi:10.1186/1471-2431-14-224.

CAPITULO 7
Enfermedad Diarreica Aguda (EDA)

Las bacterias y la virulencia ■ marta vergara

La diarrea infecciosa esta originada por la colonización y multiplicación de microorganismos a nivel del tubo digestivo los que realizan el daño por diversos mecanismos, como el toxigénico, el invasivo o un mecanismo mixto. Daño en el que participan bacterias fundamentalmente, parásitos, hongos y virus.

"La Organización Mundial de la Salud en 2009 en el informe "Para la Vida", advirtió que la diarrea es la segunda causa más habitual de muerte en los niños y niñas de corta edad, después de la neumonía. Se calcula que todos los años ocurren cerca de 4.000 millones de casos entre niños y niñas menores de 5 años. Cada año, esta afección mata a más de 1,5 millones de niños y niñas menores de 5 años, lo que representa el 17% de todas las muertes infantiles en este grupo de edad. Los niños y niñas son más vulnerables que los adultos a morir por causa de la diarrea, debido a que su organismo se deshidrata y queda desnutrido con más rapidez.

En la región de las Américas, las enfermedades diarreicas se encuentran entre las cinco causas de muerte en todas las edades en 17 países, constituyen la primera causa de muerte en cinco y la segunda en cuatro de ellos. Se estima que la enfermedad diarreica aguda constituye entre el 60 y el 80% del motivo de consultas pediátricas en los servicios de salud en América Latina.

> **La mortalidad no da una imagen completa de la carga de la enfermedad que se produce en las personas. La medida de resumen utilizada para dar una indicación de la carga de la enfermedad es la tasa de años de vida perdidos por discapacidad (Años de vida ajustados por discapacidad-AVAD). Un AVAD representa la pérdida del equivalente de un año de plena salud. África es el continente con mayor tasa de AVAD del mundo".** Boletín Integrado de Vigilancia | N° 129- SE 29 - 2012 | Página 20 de 73.

En Latinoamérica y en el Caribe la enfermedad diarreica es responsable del 20% de muertes en niños de 0 a 4 años de edad.(OMS: OPS 2010).

Las condiciones de vida de los niños en el mundo pobre, como las carencias en agua potable, sanitación, alimentación adecuada, eliminación de residuos, conduce a que sean ellos los que constituyen las estadísticas dadas.

No obstante que la EDA es un problema de salud pública mundial, presenta importantes variaciones regionales, ya sea en su incidencia, en la presentación clínica, dependiendo de la frecuencia y distribución de los agentes etiológicos. La disponibilidad de recursos para su estudio constituye otra variante a tener en cuenta.

Algunos conceptos previos:

Síndrome diarreico: Alteración en el contenido de agua, volumen o frecuencia de las deposiciones.

La OMS define a la diarrea como la producción de tres o más deposiciones de consistencia disminuída en 24 horas, o de al menos una con presencia de elementos anormales (pus, sangre o mucus).

Diarrea infecciosa: diarrea debido a una etiología infecciosa. Frecuentemente acompañada de nauseas, vómito y dolor abdominal.

Diarrea aguda: Diarrea con menos de 14 días de evolución.

Son cuatro los mecanismos involucrados:

Osmótico: es causado por la ingestión de solutos poco absorbibles, habitualmente un hidrato de carbono o un ion divalente (Mg, lactosa, sulfato de Na) estas sustancias que tienen gran poder osmótico arrastran gran cantidad de líquido, dificultando su absorción.Como consecuencia la diarrea es explosiva, abundante y cede con ayuno.

Secretor: es causado por la disminución en la absorción de agua e iones o el aumento de su secreción. Las heces son abundantes muy líquidas, espumosas y malolientes. Por lo general se producen vómitos, dolor abdominal y están involucradas en este tipo secretor, las toxinas bacterianas

como las de *V.cholerae* o *Escherichia coli* enterotoxigénico (ECET), también virus, laxantes, etc. Este mecanismo no cede con el ayuno.

Exudativo: este mecanismo ocurre como consecuencia de una alteración de la integridad de la mucosa intestinal debida a inflamación y/o ulceración causada por enteropatógenos. En este mecanismo es el colon el comprometido, y de allí invaden destruyendo microvellosidades, se adhieren a la membrana del enterocito en primer lugar para luego pasar a la lámina propia y producir reacción inflamatoria aguda, ulceraciones, microabscesos, originando heces con moco y sangre y PMN (polimorfonucleares)-algunas además sintetizan potentes toxinas contribuyendo al daño, como la toxina Shiga. Las heces son frecuentes con pus, moco y a veces sangre. Bacterias como *Salmonella, Shigella, Campylobacter, Escherchia coli* invasiva, están involucradas. Se trata de una diarrea mucosanguinolenta, la más preocupante en nuestro medio.

Funcional: es causado por un aumento en la motilidad intestinal que se traduce en una disminución de la absorción. Este mecanismo aparece con frecuencia en la diabetes, hipertiroidismo, entre otras patologías.

Considerando la población microbiana del tracto gastrointestinal, es importante recordar que se trata de un complejo ecosistema con gran número de especies bacterianas, con predominio de bacterias anaeróbicas y aeróbicas facultativas, las que se diseminan en el tracto intestinal, aún adhiriéndose a la mucosa normalmente, pero sin penetrar la pared intestinal.

La mayoría de los estos microorganismos provienen de la orofaringe, los que llegan al intestino por medio de los alimentos. Esta población microbiana, por las enzimas que libera, es importante en la circulación enterohepática. Muchas sustancias necesarias para la nutrición son metabolizadas en el hígado, conjugadas y excretadas luego en la bilis y pasadas a la luz intestinal, donde son reabsorbidas a través de la mucosa intestinal y retornadas al hígado por la circulación portal.

Si bien la conjugación incrementa la solubilidad de los metabolitos en la bilis, no todos tienen buena reabsorción a nivel de la mucosa intestinal, por lo que muchas de las enzimas producidas por este contenido intestinal, liberan los productos originales de estos compuestos conjugados, los que sí pueden ser mejor reabsorbidos a través de la pared intestinal.

La probabilidad de infección del tracto intestinal se ve afectada por la presencia de mucus, el que protege las células epiteliales y actúa como barrera contra la infección. También contiene la IgA secretora que funciona como la defensa inmune local del huésped, además de ácidos, enzimas y la

bilis. Por interferencia bacteriana, los microorganismos del contenido intestinal pueden prevenir el establecimiento de patógenos.

Los microorganismos recurren a diversas estrategias para adherir a la célula epitelial del tracto intestinal. La motilidad, le posibilita a *Vibrio cholerae* y algunas cepas de *E. coli*, atravesar la capa mucosa y adherir a las células epiteliales.

Muchos otros microorganismos tienen capacidad de sobrevivir en presencia de ácidos, bilis y enzimas proteolíticas.

Otros como *Salmonella* y *Vibrio cholerae* pueden sobrevivir cuando las concentraciones ácidas disminuyen.

La estabilidad del contenido intestinal es fundamental para evitar las infecciones intestinales.

Normalmente, microorganismos nuevos que pueden ingresar por agua o alimentos contaminados, son suprimidos por dicho contenido microbiano normal, a través de la producción de bacteriocinas y otras sustancias antibacterianas.

También la acidez estomacal, la propiedad antibacteriana de la bilis y el peristaltismo, entre otros factores, contribuyen a controlar este ecosistema y evitar el establecimiento de patógenos.

Un paradigma de esto es la infección por las salmonelas, por alimentos contaminados. Normalmente los individuos son resistentes a la infección por estas bacterias y se requiere un alto inóculo para iniciarla. Si la población microbiana habitual fue suprimida por antimicrobianos, la susceptibilidad a la infección aumenta y pequeños inóculos son suficientes para iniciar una infección.

En general las bacterias toxigénicas actúan sobre el intestino delgado y las invasivas actúan primariamente en el colon (*Shigella* y *Campylobacter*).

El camino al Daño

Escherichia coli es el principal anaerobio facultativo de la población microbiana que reside en el colon humano.

Las cepas de *Escherichia coli* (*E.coli*) asociadas a diarrea han sido clasificadas en base a criterios clínicos, epidemiológicos y moleculares, en seis grupos. Cada grupo tiene factores de virulencia específicos que sirven para su identificación, como la interacción con la mucosa intestinal, sindromes diarreicos, presentación epidemiológica y serogrupos y serotipos

basados en los antígenos O y H. Estos patógenos producen diarrea principalmente en niños pequeños.

La diseminación de *E. coli* diarrogénico es por contaminación fecal de agua o alimentos. La infección es más frecuente en las regiones tropicales durante los meses de verano o época de lluvias.

Los grupos diarrogénicos patógenos de *E.coli* ocasionan diarrea en sujetos sanos:-*E. coli* enterotoxigénica (ECET), enteroinvasiva (ECEI), enterohemorrágica(ECEH), enteroagregativa (ECEA), adherente difusa (ECAD) y enteropatógena (ECEP).

Dónde se asientan principalmente estos patógenos: ID (intestino delgado) IG (intestino grueso).

COLERA..... ID ECET..... ID ECEP .....ID

ECEH ..... IG ECEI ..... IG *Salmonella* .....ID

Shigella ..... IG *C. jejuni* ..... ID IG

> ECEI:

ECEI es una enterobacteria similar a las shigellas. Invade el epitelio intestinal, y produce una reacción inflamatoria y enfermedad disentérica con fiebre, severa inflamación, sangre y mucus en las heces. La mayoría de pacientes presentan diarrea acuosa y sólo algunos tienen disentería clásica con deposiciones con sangre, moco, dolor abdominal, pujo, tenesmo, fiebre elevada y toxicidad sistémica.

Los mecanismos que conducen al daño son semejantes a los que utiliza *Shigella.* Producen enfermedad luego de invadir la mucosa intestinal. Su adherencia a la célula epitelial de la mucosa intestinal se realiza, probablemente, por proteínas de membrana externa que funcionan como adhesinas.

Produce diarrea aguda en niños de bajo nivel socio económico y sanitación y requiere un inóculo 1000 veces mayor que *Shigella*, para causar enfermedad.

La multiplicación inter e intracelular determina la destrucción celular en las células epiteliales del colon.

Casi todas las cepas de ECEI poseen antígenos somáticos relacionados con serotipos de *Shigella*, lo que demuestra la similitud de estos dos grupos de microorganismos.

No producen toxinas termolábiles (LT) ni termoestables (ST) ni toxina shiga.

El diagnóstico de ECEI se puede efectuar a partir del aislamiento primario en la materia fecal, estudiando su comportamiento bioquímico, su caracterización serológica, su capacidad invasiva (por el test de Sereny) o por ELISA que detecta las proteínas de membrana asociadas a la invasividad o por sondas de ADN que detecta los genes para la invasividad.

La identificación de las cepas ECEI por serotipado puede ser de utilidad.

> *ECEP*

E. coli enteropatógena (ECEP) fue la primera de las *Escherichia coli* en describirse y es tal vez uno de los microorganismos más estudiados.

En los países en vías de desarrollo, ECEP es uno de los principales agentes productores de la diarrea infantil, en especial en niños menores de dos años, con elevadas tasas de morbi- mortalidad.

Establecida la bacteria en mucosa intestinal, se desencadena un mecanismo complejo que conduce a la diarrea.

La ausencia de mecanismos toxigénicos e invasivos, mantuvo la controversia acerca de su responsabilidad en la diarrea, la que finaliza al demostrarse que ECEP causa diarrea por mecanismos distintos de los toxigénicos o exclusivamente invasivos.

Es el agente causal predominante de diarrea en niños que viven en países en vías de desarrollo.

ECEP se adhiere a la mucosa intestinal produciendo aplanamiento de las vellosidades con lesiones histopatológicas características tipo "adhesión y borramiento" (adherencia / destrucción) o lesión A/E (attaching and effacing) y cambios inflamatorios.

En la producción de la lesión A/E por ECEP, las bacterias se *adhieren* a los enterocitos por lo que se observan cambios importantes en el citoesqueleto de la célula hospedadora.

Se produce la acumulación de la actina polimerizada del citoesqueleto en la región apical de la célula, hasta formar una estructura de tipo "pedestal" o "copa" y causar la *eliminación* de las microvellosidades intestinales.

Se especula que varios son los procesos que ocurren:

- la destrucción de las microvellosidades del enterocito, la salida masiva de iones hacia la luz intestinal y la secreción de alguna enterotoxina.

La lesión se lleva a cabo mediante un mecanismo de virulencia complejo, que induce la degeneración de las microvellosidades y altera la morfología normal de la región apical del enterocito.

Para fines prácticos, el modelo de patogénesis de EPEC se divide en tres fases:

- adherencia inicial, que se realiza entre las mismas bacterias y adherencia de las bacterias a las células del huésped. Las bacterias quedan estrechamente adheridas al enterocito con la membrana ahuecada o envolviendo parcialmente las bacterias.
- inyección de factores
- transducción de señales
- contacto íntimo

El principal mecanismo de ECEP es mediante la característica lesión histopatológica A/E con destrucción de las microvellosidades, la ausencia de enterotoxinas de fuerte invasividad lo distinguen de otros *E. coli* y otros patógenos entéricos.

La adherencia inicial está relacionada con la producción de la fimbria BFP (Bundle Forming Pilus), la cual se requiere para la producción de diarrea por ECEP. La expresión de la fimbria BFP de ECEP está codificada en el operón *bfp*.

Muchos genes involucrados en la virulencia, en especial aquellos implicados en la secreción de proteínas por el sistema de secreción tipo III, son trasportados en las "islas de patogenicidad" (**Capítulo 1**). Esto es de relevancia para entender la patogenicidad de estas bacterias y de *Pseudomonas aeruginosa, Shigella flexneri, Salmonella* Typhimurium entre otros.

Entre esos genes, son relevantes:

El *bfp* gen que codifica el BFP, referido antes, que tiene la propiedad de formar agregados en grumos, responde positiva o negativamente a señales ambientales que pudieran encontrarse en el hospedador y determina la adherencia bacteriana a la superficie de las células del epitelio intestinal.

El gen *eae* que codifica la lesión A/E, (*eae*A codifica para la intimina, la proteína de adherencia íntima y el *eae*B codifica para una proteína secretoria) está dirigida por una isla de patogenicidad conocida como locus del borramiento del enterocito (LEE).

Muchos de estos genes codifican proteínas que alteran los microfilamentos de actina dentro de la célula intestinal del huésped.

Algunos autores sostienen evidencias de la producción de una citotoxina muy similar o idéntica a la toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1 y se

sugiere que esa toxina puede ser un importante factor en la enfermedad, como también sugieren, existe una moderada invasión.

Por análisis por microscopía electrónica del tejido yeyunal, se demostró que el glicocálix estaba disuelto cubriendo la superficie luminar del enterocito y la existencia de una franja de desorganización de las microvellosidades.

El daño intracelular del enterocito se evidenció por las alteraciones producidas en los lisosomas y retículo endoplásmico.

El diagnóstico de laboratorio de infecciones por ECEP se realiza mediante la detección de los genes codificadores de los factores de virulencia específicos, mediante el uso de sondas de ADN para el gen *bfp* y el *eae* principalmente.

A pesar que se conocía muy bien el mecanismo de agresión al enterocito por estos enteropatógenos, no estaba dilucidada la causa de la producción de agua. Se especula que la acción del AMPc (3'- 5' adenosin monofosfato cíclico) en la diarrea se vincula además, a una proteína secretoria que actúa en la fosforilación de las proteínas de membrana, de modo similar a como lo hacen las enterotoxinas.

Conocidos como los clásicos enteropatógenos, en la década del 40, se reconocen como causante de la diarrea endémica infantil en el mundo no desarrollado y de brotes estacionales, particularmente en el primer año de vida. Producen una diarrea acuosa, sin sangre, acompañada de vómitos y fiebre leve. Por lo general la diarrea es aguda pero puede ser persistente (> de 14 días) o crónica. La relevancia clínica de la diarrea crónica es mayor en niños de países pobres dado el estado nutricional.

Es reconocido que su adquisición tiene que ver con la contaminación de alimentos y agua.

Es una de las más severas categorías de *E. coli* diarrogénicos.

> *ECEA*

Estas cepas se definen por el modelo de adherencia a células en cultivos celulares (HEp2) que es claramente distinguible y se clasifican en base a dicho patrón en: *E. coli* de adherencia localizada (ECAL), *E. coli* de adherencia agregativa (ECAA) y *E. coli* de adherencia difusa (ECAD).

El patrón de adherencia en general es en acumulaciones, ya sea al vidrio o a la mucosa intestinal.

Las distintas ECEA adhieren al epitelio intestinal produciendo inflamación y daño de la mucosa intestinal. Secretan una o más enterotoxinas que producen diarrea secretoria.

La diarrea es aguda, acuosa, con fiebre leve y vómitos. Algunos pacientes presentan sangre en las heces. La diarrea también puede ser persistente y estar asociada a desnutrición.

A pesar de su controversial papel en la diarrea de alguna de sus cepas, fueron reconocidas por primera vez como causa de diarrea en 1987.

Se trata de un microorganismo no invasivo y que posee adhesinas aún no bien caracterizadas.

Se proponen como factores de virulencia en el fenotipo agregativo:

- Un plásmido de adherencia pAA que codifica la expresión de fimbrias de adherencia, como AAF/I y AAF/II y una enterotoxina termoestable llamada ESAT.
- La ESAT tiene algunas semejanzas con la enterotoxina termoestable de ECET y parece actuar por un mecanismo similar.
- La citotoxina pet (enterotoxina codificada por plásmido) es la encargada de la separación de las células en cultivos celulares y lesión intestinal.
- Una hemolisina, asociada a la hemolisina producida por cepas uropatógenas de *E. coli.*

ECEA es diagnosticada por el aislamiento de *E. coli* de las heces de pacientes y la demostración del patrón típico agregativo AA en ensayos de adherencia a células HEp2.

En modelos animales se ha visto que ECEA induce lesiones patológicas severas en el intestino, en los que las vellosidades son destruidas y aplanadas.

Esta modificación patológica de la estructura hace pensar que, estas cepas están asociadas clínicamente con diarrea prolongada.

Los cambios histopatológicos en los modelos animales, al inocularse cultivos de estas cepas y el síndrome de neurotoxicidad que se produce, sugieren la participación de varias toxinas.

> *ECEH*

Todos los seres humanos y los animales portan la bacteria *E coli* en sus intestinos. Estas bacterias son parte normal y generalmente inofensiva de nuestra población microbiana.

Hay cepas particulares de *E. coli* que son capaces de producir toxina simil Shiga o verotoxinas. Estas cepas se denominan ECEH (Stx1, Stx2 y variantes de Stx2).

La *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) es un conjunto de *E. coli* patógenas, que puede causar diarrea o colitis hemorrágica en los humanos y en algunos casos fallo renal agudo que requiere cuidados intensivos.

En ciertas circunstancias la colitis hemorrágica deriva en enfermedad más severa, como el síndrome urémico hemolítico (SUH), una causa importante de insuficiencia renal aguda en niños y morbilidad y mortalidad en adultos.

Recién en 1982, se reconoce a *E. coli* O157: H7 (ECEH O157:H7) como la cepa responsable de un brote de colitis hemorrágica. Se inician así los estudios asociados a su patogenicidad.

Son las únicas *E. coli* enteropatógenas con carácter zoonótico.

El reservorio de ECEH es el tracto gastrointestinal del ganado joven y otros herbívoros grandes, como los rumiantes, en especial el ganado bovino y las ovejas, que se infectan sin presentar síntomas y eliminan el organismo en las heces.

ECEH puede sobrevivir en el medio ambiente por extensos períodos de tiempo e incluso a pH muy bajo. Por ejemplo en vegetales y otros alimentos y bebidas, puede desarrollarse.

Los brotes se relacionan fundamentalmente con el consumo de carne poco cocida.

Los humanos adquieren la ECEH O157:H7 por contacto directo con los portadores animales, sus heces y el suelo o agua contaminados, o a través de la ingestión de carne molida mal cocida, otros productos derivados de animales o vegetales y frutas contaminadas.

Teniendo en cuenta que el inóculo infectante es muy bajo, alrededor de 100 bacterias, el riesgo de contraer la enfermedad es elevado.

Las infecciones con ECEH de otros serogrupos, incluyendo miembros de O26, O91, O103, O104, O111, O113, O117, O118, O121, O128 y O145, se reconocen cada vez más como las causas de colitis hemorrágica y SUH. Algunos de estos organismos pueden ser tan importantes en la enfermedad de los humanos como la ECEH O157:H7; sin embargo, no son reconocidos en los medios que se utilizan para aislar esta bacteria y muchos laboratorios no realizan exámenes de rutina para detectar otras cepas.

Aunque muchas ECEH parecen transportarse en animales asintomáticos, miembros de algunos serogrupos no-O157 pueden causar enfermedad entérica en animales jóvenes. En los conejos, la ECEH O153 se ha asociado a una enfermedad que se asemeja al SUH.

ECEH se adhiere a las células epiteliales de la mucosa intestinal por adhesinas no bien caracterizadas, probablemente fimbriales y produce una o más toxinas Shiga que son su principal factor de virulencia y responsables de las complicaciones intestinales y sistémicas.

Las toxinas shiga (también denominadas verotoxinas) son citotóxicas para las células Vero. Son codificadas en bacteriófagos relacionados que inducen la muerte de la célula huésped por destrucción de la maquinaria de síntesis de las proteínas ribosómicas. Las proteínas que produce y secreta ECEH, están involucradas en la patogenicidad al posibilitar la adherencia de las bacterias tanto a los alimentos como al intestino humano. Actúa también en la intensa respuesta inflamatoria producida por ECEH y puede explicar la habilidad de estas cepas para causar infecciones tan severas como SUH.

La verotoxina originalmente fue descripta en 1977 por Konawalchuk, es codificada por bacteriófagos temperados y es activa sobre células Vero y HeLa por lo que se la denominó verotoxina 1 o toxina símil Shiga 1 o Shiga-Like-Toxin (SLT).

Está relacionada con la toxina elaborada por *Shigella dysenteriae* 1 que provoca agregación plaquetaria además de asociarse a daño en el endotelio, depósito de fibrina y formación de microcoágulos. Todo ello asociado a la interacción entre el endotelio capilar y las plaquetas.

Es una toxina del modelo A-B, donde el pentámero B de unión, interacciona con el glucolípido globotriaosilceramida y glucoesfingolipidos relacionados.

Una vez que la subunidad A es interiorizada por endocitosis, mediada por el receptor, se transporta al retículo endoplásmico y cataliza una reac-

ción de inactivación enzimática del ARN 28S, lo que lo hace no funcional. Este proceso conduce a la muerte de la célula huésped por destrucción de la maquinaria de síntesis de las proteínas ribosómicas.

El daño en las células endoteliales vasculares que explican el SUH es responsabilidad de la toxina también cuando se combina con el LPS ya que, mediante el FNT y la IL-1 que dispara, se incrementa la expresión del receptor globotriaosilceramida en dichas células.

Los *E. coli* pueden ser lisados por los bacteriófagos que los albergan, si los mismos son sometidos a antimicrobianos u otro tipo de stress, liberando grandes cantidades de toxina Shiga, la que se disemina desde el tracto gastrointestinal unida a los leucocitos.

Las cepas de *E. coli* que comparten con ECEP la capacidad de adherirse por el mecanismo A/E codificado por la isla de patogenicidad LEE, son las que se denominaron ECEH, no así otros *E. coli* que también producen toxina Shiga.

Hay diferentes cepas de ECEH y su identificación puede ser útil para encontrar de forma más precisa la fuente de un brote particular.

Los síntomas a nivel gastrointestinal se caracterizan por una diarrea acuosa con intenso dolor abdominal seguida en unos días por deposiciones con rasgos de sangre o colitis francamente hemorrágica.

De estas cepas de ECEH, en especial el serotipo 157:H7, puede causar brotes o casos esporádicos de diarrea, colitis hemorrágica, púrpura trombocitopénica (PPT), SUH y muerte, todos sindromes asociados a la toxina Shiga.

ECEH O157:H7 es, como vimos, el serogrupo más conocido y más frecuentemente asociado a SUH y es el prototipo de un grupo (designado también EHEC o ECEH). Grupo con más de 150 serotipos de *E. coli* que tienen similar poder patogénico y entre los que, con mayor frecuencia se encuentran: O103:H2, O26:H11, O111:NM, O113:H21, O145:NM.

Todos los serotipos de ECEH comparten, además de la toxina Shiga, (Stx) estos principales factores de virulencia:

- la llamada fimbria EHEC, involucrada en la adherencia, codificada por un plásmido de 60 MDa
- una enterohemolisina designada (E- Hly)
- la intimina, codificada por el factor cromosómico *eae*A, que vimos en ECEP, responsable de la lesión A/E

ECEH produce diarrea sanguinolenta y por oposición a la clásica disentería, no evidencia respuesta inflamatoria y destrucción de la mucosa,

es decir se trata de una diarrea con abundante sangre. Se estima que alrededor del 30 % de las diarreas disentéricas de niños son causadas por ECEH.

Ha sido responsable de los brotes más grandes de infección y con tasas más elevadas de complicaciones.

Estas cepas parecen ser más patogénicas que cepas que producen toxina shiga pero no son ECEH.

El SUH se inicia con diarrea acuosa que en dos o tres días pasa a sanguinolenta con moco, sangre o ambos en niños previamente sanos.

Es una entidad clínica y anatomopatológica caracterizada por insuficiencia renal aguda, trombocitopenia y anemia hemolítica, pudiendo afectar otros parénquimas como el sistema nervioso central, intestino, páncreas, en especial.

Aproximadamente el 5% a 10% de los niños desarrollan complicaciones sistémicas como SUH caracterizado por insuficiencia renal aguda, trombocitopenia y anemia hemolítica. El prototipo y miembro más virulento de este grupo es la *E.coli* O157:H7.

En diferentes partes del mundo muchos otros serotipos han siso asociados a SUH.

También los ancianos pueden padecer de SUH con una tasa de letalidad cercana al 50%.

Los niños son altamente susceptibles al serotipo O157:H7, por lo que el elevado índice de SUH en ellos está hablando de que los alimentos, el agua, o los ambientes donde ellos desarrollan sus actividades, son las principales fuentes de infección.

En un trabajo realizado por Marta Rivas y colaboradores entre 2001 y 2002 en dos centros de atención médica en nuestro país, sobre 150 casos y 299 controles con edad promedio de 2 años, el serotipo encontrado en la mayoría de ellos fue el O157:H7 y los principales factores de riesgo identificados fueron el consumo de alimento cárnico de baja cocción, contactos con animales de granjas y con menores de 5 años con diarrea. Enfatizan los autores en el lavado de manos al manipular alimentos, la cocción de los mismos y la no exposición a animales y su ambiente como a otros niños con diarrea, como medidas a tener en cuenta para la prevención.

Nuestro país, Argentina, es el país donde se diagnostica el mayor número de casos de todo el mundo, alrededor de 300 casos nuevos por año.

Es importante tener presente que nuestro país es el país de mayor índice de consumo de carne bovina del mundo, alrededor de 61 Kg por habitante por año.

Vigilancia integrada de síndrome urémico hemolítico 27 de enero de 2015 – Boletín Integrado de Vigilancia – Secretaría de Promoción y Programas Sanitarios – Ministerio de Salud de la Nación (Argentina)…… ."Introducción El síndrome urémico hemolítico (SUH) es una enfermedad de comienzo agudo con anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, y daño renal que se presenta generalmente a continuación de un episodio de diarrea con o sin sangre, principalmente en niños menores de 5 años. Estos síntomas pueden acompañarse con fiebre, vómitos, dolor abdominal, y anuria u oliguria. Además, puede afectar otros órganos como sistema nervioso central, pulmones, páncreas y corazón, y llevar a la muerte debido a complicaciones neurológicas, intestinales, cardíacas o a infecciones intercurrentes. El período de incubación es de dos a diez días, con una media de tres o cuatro días, y el de transmisibilidad hasta tres semanas o más en los niños y de una semana o menos en los adultos, después del comienzo de la diarrea. En Argentina el agente etiológico más comúnmente asociado a SUH es un patógeno zoonótico transmitido por los alimentos y el agua: *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC), cuyo serotipo más frecuente es O157:H7, aunque hay más de 100 serotipos que poseen un potencial patógenico similar. Recientemente se reportó la casi exclusiva circulación de cepas de *Escherichia coli* O157 hipervirulentas. Estas cepas son responsables de una enfermedad más severa, de progresión rápida y altos porcentajes de hospitalización, que dificultaría el diagnóstico durante la primera fase de diarrea, detectándose el agente etiológico recién establecido el SUH. Presentación de los datos El presente informe describe la situación del SUH a la semana epidemiológica N° 2 del año 2015. Dada la interacción entre distintas fuentes de información y el chequeo constante de los datos, existen modificaciones a los totales nacionales y algunos cambios en la información provincial que hasta el momento no han alterado significativamente las tendencias que se venían observando. Este informe expone información proveniente de las tres estrategias formales de vigilancia del Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS) existentes actualmente para el evento analizado: módulo de Vigilancia Clínica (C2), módulo de Vigilancia por Laboratorios (SIVILA) y módulo de Unidades Centinela (UC-SUH). Se consolidan los datos contenidos en tres bases y se revisan registro por registro a partir de algunas claves tales como documento nacional de identidad (DNI), nombre y apellido de los afectados, así como otros datos de interés. Se utiliza como referencia temporal la fecha de inicio de síntomas. En los últimos 10 años se constata una tendencia a la disminución de los casos de SUH a nivel agregado para Argentina con un

leve aumento en el año 2014; la tasa promedio para todo el periodo es de 1,09 casos cada 100.000 habitantes, mientras que para el año 2014 fue de 0,9 casos. La media de casos para el periodo de estudio fue de 441, siendo 390 el número de casos notificados hasta la fecha en 2014. En el período analizado el año con menor número de casos fue 2010, con 350 notificados, y el año con mayor número de casos fue 2008, con 543. Al compararse los casos entre los años 2010 y 2014, se observa en los menores de 5 años que se mantienen alrededor de 300 por año, con el mayor número en 2011 (358 casos) y el menor en el año 2013 (285 casos). …."

Otros agentes bacterianos se asocian también al SUH.

> *ECET*

Es la causa más común de diarrea en niños en el mundo pobre, especialmente en climas tropicales y de adultos que viajan a esas áreas, ocasionando la llamada "diarrea del viajero", diarrea acuosa, sin fiebre.

Esta bacteria se adquiere por el consumo de agua y alimentos contaminados.

La incidencia anual de infecciones por ECET es estimada en alrededor de 650 millones de casos de diarrea y 800000 muertes en niños menores de 5 años de edad.

Las cepas de ECET se conocieron hacia la década del 60 y en la década del 70 se las asocia a la diarrea en el hombre.

Esta bacteria coloniza el intestino delgado, donde pocas bacterias lo hacen, previa adherencia a la superficie epitelial mediante estructuras proteicas fimbriales llamadas factores de colonización (CFs) que adhieren a receptores específicos en el intestino delgado.

La biosíntesis de los CFs es plásmido dependiente. Si se pierde el plásmido respectivo, lo que puede ocurrir en el laboratorio por repiques sucesivos, no se sintetiza el antígeno de adherencia y en consecuencia la cepa no puede colonizar, ni por cierto inducir la enfermedad diarreica.

La función primordial de estas fimbrias es la de promover la fijación de la bacteria a la mucosa intestinal.

Dado que estas adhesinas son de tamaño pequeño, no están sometidas a fuerzas de repulsión en la misma escala que el microorganismo y pueden actuar de puente entre el germen y el sustrato.

La adherencia en estas cepas, depende de la interacción entre los factores de colonización y sus receptores específicos en la mucosa intestinal.

Para ello, estas adhesinas tienen configuraciones complementarias de la de los receptores celulares, que facilitan combinarse de manera estereoespecífica, formando una gran cantidad de enlaces independientes que aumentan la naturaleza de las uniones.

Esta especificidad probablemente sea importante y determine mucho de la virulencia de estas cepas. Además, las cepas adherentes parecen ser menos sensibles a la acción bactericida del suero.

Muchos de los receptores para estas adhesinas se encuentran en los glóbulos rojos, de tal modo que las bacterias al unirse, producen hemaglutinación, la que puede ser interrumpida por el agregado de azúcares, como D-manosa, que imitan al verdadero receptor que, al competir, inhiben la aglutinación.

Este mecanismo posibilita un método para clasificarlas en manosa sensibles o manosa resistentes, según sea el comportamiento frente al azúcar **(Capítulo 1).** De importancia esta clasificación en el estudio de estos microorganismos.

Todas estas fimbrias confieren mayor hidrofobicidad, siendo ésta mayor al aumentar el número de pilis de la bacteria.

Para el estudio de estos CFs se recurre además a otros métodos que utilizan anticuerpos monoclonales o policlonales.

Luego de vencer las diversas defensas del huésped, la bacteria, que logró fijarse y adherirse, puede iniciar el proceso patológico dependiente de las enterotoxinas que, desde su lugar de adhesión, libera.

Esta fijación de la bacteria, representa el establecimiento de una cabecera de playa desde donde inicia la elaboración de dos bien estudiadas enterotoxinas que causan los síntomas, una toxina termolábil (LT) y otra toxina termoestable (ST), ambas codificadas por plásmidos.

La LT está íntimamente relacionada con la toxina colérica y en especial produce una diarrea secretoria y la ST se asocia más a una diarrea no secretoria.

Para el establecimiento de la enfermedad diarreica, es necesaria la adhesión, previa a la acción de las enterotoxinas. Mecanismos de patogenicidad ver en (**Capitulo 1**).

La ausencia de daño en la mucosa intestinal, un epitelio intacto, sin invasión ni reacción inflamatoria, produciendo una diarrea hipersecretoria con pérdida de agua y electrolitos, son las características distintivas de ECET.

El diagnóstico de estas cepas se realiza a partir del cultivo primario de heces y la identificación de cepas de *E. coli* y la demostración de las toxinas, LT y/o ST.

En general estas categorías de *E. coli* (ECET, ECEI, ECEH, ECEA, ECAD y ECEP) han sido implicadas en la diarrea persistente en los niños del mundo en desarrollo y también del mundo industrializado, aunque existen aún comunicaciones conflictivas en este aspecto.

> *Shigella* spp.

Las distintas especies de *Shigella* constituyen la principal causa bacteriana de disentería, diarrea caracterizada por eliminación frecuente de heces las que contenien pus, sangre y/o mucus.

El ser humano es el único reservorio conocido de este agente. La mayoría de los casos ocurren en niños, en general y por contaminación con agua o alimentos contaminados.

Esta bacteria constituye un serio e importante problema de salud publica mundial, debido fundamentalmente a su elevada transmisibilidad, la emergencia de cepas resistentes a antimicrobianos y la falta de vacunas efectivas.

Shigella es un bacilo gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, (características de esta familia se comentan en **Capítulo 2**) bacteria estrechamente relacionada con el genero *Escherichia*, por sus propiedades bioquímicas, serológicas y por similitudes genéticas.

Se caracteriza por no fermentar la lactosa, ser inmóvil, no produce lisina decarboxilasa y raramente produce gas a partir de hidratos de carbono.

Su identificación se basa en características bioquímicas y antigénicas. En base a ello se describen cuatro especies, todas ellas pueden causar disentería, aunque con diferente gravedad.

Se conocen ya 47 serotipos de *Shigella* los que se agrupan según semejanzas serológicas y de fermentación de hidratos de carbono en cuatro grupos: grupo A con *Shigella dysenteriae*, grupo B *Shigella flexneri*, grupo C *Shigella boydii* y grupo D *Shigella sonnei.*

Shigella dysenteriae es la principal responsable de la disentería bacilar, enfermedad de elevada transmisibilidad e infectividad.

S. dysenteriae 1 es poco frecuente en nuestro país y se la asocia al SUH.

Las otras especies de *Shigella* causan las diarreas inflamatorias disenteriformes.

La enfermedad puede ocurrir a cualquier edad. *Shigella* invade las células colónicas y rectales. Los microorganismos ingeridos son captados hacia vesículas por las células, en forma similar a la fagocitosis.

Parece ser que la bacteria gatilla su propia entrada a la célula por medio de diversas proteínas, como en la fagocitosis. Varios genes se involucran en la capacidad de las shigelas, que aún siendo inmóviles logran aproximarse a la superficie mucosa antes de la invasión celular.y luego invadir aún células adyacentes, pues son bacterias muy invasivas. Invaden las células epiteliales humanas, se multiplican en su interior y se diseminan de una célula a otra. Esto lleva al desarrollo de úlceras mucosas focales a través de las cuales exudan eritrocitos y leucocitos produciendo la típica deposición disentérica.

La invasión de las células intestinales y la supervivencia, constituye un complejo proceso que involucra a múltiples genes.

Diversas proteínas de membrana externa codificadas por plásmidos-(IPA) (antígenos para la invasión plasmídica) – intervienen en la ruptura de la pared del fagosoma y se secretan al medio. Las proteínas IPA sólo parecen actuar luego de que las bacterias han ingresado.

Las cepas que causan la disentería bacilar tienen el mismo mecanismo de secreción de tipo III por el cual invaden la mucosa intestinal.

Mediante este sistema de secreción tipo III puede la bacteria inyectar proteínas, entre ellas IPA, desde el citoplasma bacteriano hasta el citosol de las células mucosas del huésped. De esta forma participan en la relación que se establecerá entre la bacteria y el huésped.

Se postula que las shigellas expresan el fenotipo *olm* (organelle-like movement) (organelas que semejan movilidad) el cual les posibilitaría diseminarse a través del citoplasma y a lo largo de los filamentos de actina y que mediante la expresión del fenotipo *ics* (intra-inter-cellular spread) (diseminación inter e intracelular) pueden multiplicarse y colonizar las células adyacentes.

La infección es superficial y sólo pocas veces el microorganismo llega a sitios más remotos de las mucosas. La bacteriemia es infrecuente (no se las encuentra en hemocultivos) salvo en *S. dysenteriae* tipo 1 por ser resistente al poder bactericida del suero.

La disentería bacilar resulta de la adherencia, e invasión de células epiteliales de la mucosa del íleon terminal y colon, con inflamación y ulceración de la misma. Como se comenta en ECEP, también *Shigella flexne-*

ri, la especie más involucrada en la EDA, es patógena debido que poseen grandes segmentos de ADN, llamados islas de patogenicidad que albergan y transportan los genes de virulencia.

Las lesiones inflamatorias en la mucosa colónica afectada por *Shigella* se hallan fundamentalmente a nivel de las placas de Peyer, lo que sugiere que la bacteria podría ingresar inicialmente por las células M (naturalmente fagocíticas ya que son enterocitos especializados en captar antígenos luminales, que carecen del recubrimiento de glicocaliz en su superficie luminal y presentan pliegues en lugar de las microvellosidades característicos de los enterocitos) y presentarla al tejido linfoide de la placa de Peyer subyacente. También se observa el ingreso a través de células no fagocíticas.

Por estos mecanismos la bacteria, inmóvil, puede moverse en el citoplasma de la célula infectada y diseminarse.

Una vez que las bacterias se han internalizado, se produce la lisis de la membrana unida a la vacuola fagocítica. Una proteína lítica, la hemolisina ayuda este proceso.

Las células adyacentes invadidas mueren rápidamente y son eliminadas, (parece ser que la muerte de la célula huésped se produce fundamentalmente por un proceso de bloqueo de la respiración celular) dando lugar a la formación de úlceras focales y al desarrollo de una respuesta inflamatoria en la lámina propia. Este efecto deletéreo en el epitelio colónico, da la característica diarrea disentérica con deposiciones mucosanguinolentas.

"En cultivos celulares, la bacteria inicialmente se adhiere a la célula, provoca la reorganización de la actina del citoesqueleto celular en las inmediaciones y la formación de pseudópodos. La célula huésped, normalmente no fagocítica engloba e ingiere a la bacteria adherida, la cual a su vez escapa del fagosoma y se multiplica en el citoplasma de la célula HeLa. Continúan produciéndose reordenamientos de actina en la vecindad de la bacteria que le permiten moverse a través de la célula y luego pasar a otra contigua. Una vez libre en el citoplasma, la bacteria exhibe dos tipos de movimiento, por un lado, la polimerización de actina en un extremo de la bacteria crea una estructura tipo "cola de cometa" formada por actina polimerizada, que propulsa a la bacteria a través del citoplasma, por otro lado también se ha observado movimiento unidireccional de la bacteria a lo largo de filamentos de actina". Por estos mecanismos invaden y destruyen la mucosa intestinal del colon provocando disentería. Idéntico mecanismo ocurre en *Listeria monocytogenes* al usar la actina para impulsarse a través del citoplasma de la célula infectada y propagarse a células vecinas. ECEP

también usa esta maquinaria de polimerización de la actina para adherirse íntimamente o para desplazarse intracelularmente.

La llamada toxina Shiga, es una potente neurotoxina, que determina convulsiones. Clásicamente se creía era producida exclusivamente por *S.dysenteriae* tipo 1.

Toxinas similares se descubrieron en otras especies de shigella y en ciertas cepas de *E.coli* (Shiga like toxin). Es una toxina de tipo A-B, que se libera al medio durante la lisis bacteriana.

Esta toxina se une a las células de mamíferos, es internalizada por endocitosis y finalmente detiene la síntesis proteica a nivel ribosomal. Tiene múltiples actividades tóxicas. Actúa como neurotoxina, e induce la apoptosis, aunque como se dijo, esta ocurre aun con mutantes no productoras de toxina.

Su función principal es el SUH, causando daño a nivel de vasos sanguíneos.

Al menos dos toxinas más, con actividad de endotoxina han sido descritas en especies distintas de *S. dysenteriae*. ShET1 y ShET2 y serían responsables de la acumulación de líquidos en el asa intestinal y de la diarrea acuosa que puede observarse en la fase inicial de la shigelosis.

Lipopolisacárido: no interviene en la invasion ni diseminanción ni multiplicación intracelular, sólo contribuye al daño celular. Por ello cepas rugosas de *Shigella*, que no poseen antígeno O conservan su capacidad de invadir y replicarse en cultivos celulares, pero son incapaces de causar inflamación en el test de Sérény.

Las lesiones inflamatorias en la mucosa colónica afectada por *Shigella* se hallan fundamentalmente a nivel de las placas de Peyer, lo que sugiere que la bacteria podría ingresar inicialmente por las células fagocíticas, encargadas de captar antígenos de la luz intestinal y presentarla al tejido linfoide de la placa de Peyer subyacente. Pero también se observa el ingreso a través de células no fagocíticas.

La formación de úlceras focales y la respuesta inflamatoria en la lámina propia son las dos lesiones más características asociadas con la infección por las shigelas.

La ruta que sigue esta bacteria para lograr el daño involucra:

- adherencia por ligandos a la superficie de las células epiteliales de la mucosa intestinal.
- invasión - inducción de la endocitosis
- escape de la vacuola endocítica
- diseminación intra e intercelular

- destrucción celular y eliminación.

Las células epiteliales infectadas son inducidas a liberar citocinas proinflamatorias como la interleucina 8 (IL-8) y el factor-α de necrosis tumoral (FNTα).

Además, infectan macrófagos gatillando la liberación de (IL-1β) y otras potentes citocinas inflamatorias.

Esta respuesta inflamatoria desestabiliza la integridad y permeabilidad de las membranas, conduciendo a la expulsión de polimnorfonucleares (PMN), permitiendo el acceso de más shigelas.

En general la shigelosis es una enfermedad infecciosa causada por varias especies de *Shigella*, ya sea *boydii, flexneri, sonnei* o *dysenteriae*.

Shigella flexneri es por lejos, la de aparición más frecuente y los síntomas de la disentería que causa, incluyen dolor abdominal, diarrea, fiebre, vómito, sangre o mucus en las heces.

La bacteria es trasmitida por la ruta ano-mano-boca, siendo el agua y los alimentos, los principales vehículos de transmisión, y la higiene de manos y alimentos, la principal vía de control.

Una vez ingerida, sobrevive al ambiente del estómago y se traslada al intestino, donde adhiere y penetra en las células de la mucosa intestinal por los mecanismos ya comentados.

Las especies de *Shigella* son altamente eficientes para infectar ya que requieren un bajo inóculo. 10 a 200 bacterias son suficientes para producir enfermedad en adultos sanos, dada su resistencia al pH gástrico.

Generalmente la diarrea por *Shigella* se resuelve en 5 a 7 días, pero en algunos pacientes puede ser más refractaria a resolverse y necesitar hospitalización.

A veces la infección es severa, con fiebre muy elevada y se asocia con presentación súbita en niños menores de dos años.

Pueden algunas personas no presentar síntomas pero sí transmiten las shigelas a otros individuos no infectados.

La mortalidad por *Shigella* spp., es elevada en el mundo pobre: el 50% de los casos positivos para esta bacteria mueren en el hospital o por complicaciones posteriores.

> *Salmonella* spp.

Es una enterobacteria que para que su crecimiento sea óptimo, necesita de un pH entre 6,6 y 8,2. En cuanto a las temperaturas para su desarrollo se mantienen hasta los 5,3 a 6,2 Cº.

Son microorganismos incapaces de tolerar elevadas concentraciones de sal.

Salmonella es destruida a las temperaturas de pasteurización de la leche (Linder 1995).

Están ampliamente distribuidos en la naturaleza, y se encuentran en el tracto gastrointestinal de los mamíferos domésticos y salvajes, los reptiles, las aves y los insectos. Se trata de comensales eficaces y también patógenos que producen un espectro de enfermedades en el hombre y los animales. Algunos serotipos de *Salmonella*, tales como *S.typhi, S.paratyphi* y *S.sendai*, están muy adaptados a su huésped.

Además de la enteritis, en general estos microorganismos son causantes de infecciones sistémicas como fiebre tifoidea y otras, constituyendo un problema de salud pública en el mundo.

Según el sistema de nomenclatura de *Salmonella* usado en la Organización Mundial de la Salud (OMS) la designación taxonómica completa es, *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhimurium lo que puede abreviarse como *Salmonella* serotipo Typhimurium o *Salmonella Typhimurium*.

Ultima actualización*

La clasificación más reciente de Salmonella, basada en la secuenciación de DNA, considera solamente 2 especies: S. enteritica y S. bongori, subdivididas en subespecies and serovares. S. enteritica serotipo typhi aún se identifica en algunos textos como S. typhi, aunque no sea el término apropiado.

Clasificación clínica y serológica de especies patógenas de *Salmonella*. Ejemplo.

Clínica	Serotipo	Nombre	Serogrupo
Tifoídica	Typhi	*Salmonella enterica*, subsp. enterica, serotipo Typhi	D
	Paratyphi A	*S. enterica*, subsp. enterica, serovar Paratyphi A	A
	Paratyphi B	*S. enterica*, subsp. enterica, serovar Paratyphi B	B
	Paratyphi C	*S. enterica*, subsp. enterica, serovar Paratyphi C	C
No-tifoídica	Typhimurium	*S. enterica*, subsp. enterica, serovar Typhimurium	B
	Enteritidis	*S. enterica*, subsp. enterica, serovar Enteritidis	D
	Newport	*S. enterica*, subsp. enterica, serovar Newport	C

Modificado de: Hunter's tropical medicine and Emerging Infectious Diseases. 9th ed. Philadelphia: Saunders, 2013. (Ninth Edition)

Actualmente se reconoce una sola especie, que ha sido denominada *Salmonella enterica* (antes *S. cholerasuis*) con 6 subespecies, o subgrupos. Esta subdivisión ha sido apoyada por varios métodos de hibridación ADN/ADN que complementan el genotipado.

* Vínculos:

- Crump JA, Sjölund-Karlsson M, Gordon MA, Parry CM. Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive Salmonella Infections. Clin Microbiol Rev. 2015 Oct;28(4):901-37. doi: 10.1128/CMR.00002-15.

- John L Brusch. Typhoid Fever Treatment & Medication. Medscape. Actualización 2015.

- Wain J, Hendriksen RS, Mikoleit ML, Keddy KH, Ochiai RL. Typhoid fever. Lancet. 2015 Mar 21;385(9973):1136-45.

doi: 10.1016/S0140-6736(13)62708-7.

- Guía de Referencia Rápida. Diagnóstico y Tratamiento para la Fiebre Tifoidea. Guía de Práctica Clínica. CENETEC. SSA. Número de Registro: IMSS-259-10 El documento no incluye fecha de publicación.

Cada subespecie a su vez, está subdividida en serotipos o serovares, de acuerdo al tipo de antígeno H (flagelar) y O (somático). Se han descrito más de 2.375 serovares de *Salmonella*, que finalmente pertenecen al mismo género en base a su gran identidad en el genoma.

- Aboutaleb N, Kuijper EJ, Van Dissel JT. Emerging infectious colitis. Current Opinion in Gastroenterology. 2014; 94(13):2758-2765.

Los brotes epidémicos de infecciones intestinales causados por Salmonella spp., Campylobacter spp., Escherichia coli productora de Shiga toxina (STEC) constituyen un riesgo con nuevos hallazgos en epidemiología y características de virulencia.

- Guerrant RL, DeBoer MD, Moore SR, Scharf RJ, Lima AA. The impoverished gut--a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2013 Apr;10(4):220-9. doi: 10.1038/nrgastro.2012.239.

- Ajene AN, Fischer Walker CL, Black RE. Enteric pathogens and reactive arthritis: a systematic review of Campylobacter, salmonella and Shigella-associated reactive arthritis. J Health Popul Nutr. 2013 Sep;31(3):299-307.

- Ross AG, Olds GR, Cripps AW, Farrar JJ, McManus DP. Enteropathogens and chronic illness in returning travelers. N Engl J Med. 2013 May 9;368(19):1817-25. doi: 10.1056/NEJMra1207777.

- Perez-Montaño JA, Gonzalez-Aguilar D, Barba J, ; Pacheco-Gallardo C, Campos-Bravo CA, Garcia S, Heredia N, Cabrera-Diaz E. Frequency and Antimicrobial Resistance of Salmonella Serotypes on Beef Carcasses at Small Abattoirs in Jalisco State, Mexico. Journal of Food Protection, May 2012;75(5):867-873. (Únicamente resumen. Solicitar).

- Carrillo-Inungaray ML, Mondragón-Hernández FM. Estudio de vida útil del queso asadero. Julio-Septiembre 2011;12(3). Útil en cualquier contexto. Tipos de organismos y la Norma en México.

- Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, et al. Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. Int J Food Microbiol, 30 May 2010;139, Suppl:S3-S15. Para revisar infecciones causadas por alimentos.

- Jurado Jiménez R, Arenas Muñoz C, Doblas Delgado A, Rivero A, Torre-Cisneros J. Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. Medicine. 2010;10:3497-501.

- Puerta-García A, Mateos-Rodríguez F. Enterobacterias. Medicine. 2010;10:3426-31.

- Miranda JM, Mondragon AC, Martinez B, Guarddon M, Rodriguez JA. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of Salmonella from different raw foods in Mexico. Journal of Food Protection 2009;72 (5), pp. 966-971. (Solamente resumen).

- Gutiérrez Castillo AC, Paasch Martínez LH, Calderón Apodaca NL. Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo. Vet Méx. 2008 Mar; 39(1): 81-90.

- John N. Sofos. Challenges to meat safety in the 21st century. Meat Science, Jan-Feb 2008;78(1-2):3-13. Sobre la importancia de la contaminación de carnes con patógenos (E. coli, Salmonella, Campylobacter, virus, protozoos, medidas de control, entre otros).

Última modificación 12 agosto 2015. Universidad Nacional Autonoma De Mejico.

La mayoría de las salmonelas que producen enfermedad en el hombre pertenecen a la subespecie enterica: *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Enteritidis.

En la práctica diaria se la denomina *Salmonella* Enteritidis.

En el año 1988 nuestro grupo de trabajo descubrió los primeros casos humanos en el mundo de *Salmonella enterica* subs. *enterica* serovar Zaiman, llamada en la práctica *Salmonella* Zaiman en niños mayores de 1 año afectados de diarrea aguda infecciosa de menos de 7 dias de evolución y en una niña de muestras de hemocultivos. (Vergara Marta y cols. Revista Argentina de Microbiología 21-volumen 1 N89-91. 1989 ISSN 0325-7541).

También, en dicho período, nuestro grupo de trabajo detectó los primeros casos humanos de *Salmonella* Hadar en la República Argentina. (Vergara Marta y cols. Infectología y Microbiología Clínica volumen 1 N 3 1989).

Como comentamos más arriba, las salmonelas se clasifican en serogrupos dependientes de antígenos del polisacárido O somático, antígenos Vi capsulares y H flagelares, según el esquema de Kauffman- White.

A pesar que el serotipado puede tener una finalidad formal de identificación de cepa según el antígeno O, designados como, A, B, C, D y E, no tiene utilidad a la hora de identificar una cepa productora de fiebre entérica o no, dada la reactividad cruzada entre los serogrupos, tanto entre S. Enteritidis que causa normalmente gastroenteritis y S. Typhi que causa fiebre tifoidea, por ejemplo.

Técnicas de genotipado más discriminativas son usadas para dichos fines.

En el hombre, algunos serotipos producen una respuesta inflamatoria localizada en la mucosa intestinal causando gastroenteritis o enterocolitis y otros son responsables de enfermedad sistémica, como las fiebres entéricas tipo tifoidea.

A excepción de *Salmonella* Typhi, cuyo reservorio es el hombre, y los serotipos paratíficos, que son especies específicas para el hombre pero también pueden encontrarse en animales, todas producen enfermedades severas con sepsis y síndrome tifoideo. Los otros serovares se consideran zoonosis.

Entre esos serovares, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, sí son responsables de infecciones adquiridas por alimentos (carne, productos lácteos, huevos) derivados de animales infectados sintomáticos o asintomáticos. Tienen una amplia gama de huéspedes, tanto animales como humanos.

En nuestro país, las infecciones por *Salmonella* no tifoidea en humanos, se asocian cada vez más a productos alimentarios. La fuente alimentaria está fehacientemente documentada como proveniente de animales bovinos y aves de corral infectados, sus huevos y productos cárnicos.

Es importante recordar la capacidad de multiplicación de estas bacterias, en el interior del huevo, antes de que la cáscara haya sido totalmente formada. De allí la importancia en la prevención de estas infecciones, la que debe transitar no solo por la higiene exterior de los huevos.

La habilidad de las salmonelas para sobrevivir dentro del fagocito y su especial transferencia de material genético involucrado en la resistencia a antimicrobianos, hace que sean importantes agentes en infecciones bacteriémicas en personas desnutridas e inmunosuprimidos, con enfermedades malignas y especialmente SIDA.

En general, como veremos por su mecanismo, no hay destrucción extensiva de la mucosa.

Inicialmente se creía que la infección por *Salmonella* empezaba con la unión de la bacteria al ileon y luego penetraba el intestino a través de la célula M.

Actualmente se sugiere que la infección ocurre en el intestino delgado y en parte del colon, especialmente la región cercana al recto.

Las investigaciones en monos sugieren que la entrada del microorganismo se asocia más con las microvellocidades de los enterocitos que con las células M.

El hecho de encontrar la salmonella en los enterocitos varios días después de la infección abona esta suposición que se extiende a entender la demora en la entrada de la bacteria al torrente sanguíneo, permitiendo la acción de los macrófagos activados para eliminar la bacteria.

Estas bacterias codifican sistemas de secreción tipo III en el interior de la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella*, necesario para que se produzca la endocitosis y la invasión del epitelio intestinal. *Salmonella* tiene dos sistemas de secreción tipo III, codificados por dos islas de patogenicidad distintas SPI-1 y SPI-2, asociados a su penetración inicial, de la inyección de proteínas y del reacomodamiento de los filamentos de actina **(Capitulo 1).**

La acidez gástrica es la barrera inicial de la colonización. El aumento del pH gástrico, aumenta sensiblemente la susceptibilidad a la infección.

Una vez que la bacteria ha alcanzado el intestino, antes de entrar en contacto con las células epiteliales del mismo, el primer paso será escapar

a los factores adversos que se secretan en la luz intestinal, como péptidos antimicrobianos, sales biliares y la IgA secretoria.

La adherencia a las células epiteliales se realiza por varios tipos de adhesinas, fimbrias codificadas en plasmidos, estas se encuentran codificadas por el gen de 90 Kpb *pef,* y se encuentran en el plasmido denominado pSLT, plásmido muy importante pues se encuentra en todas la cepas patógenas de la bacteria.

La delación de este gen genera mutantes avirulentas.

Otros genes productores de fimbrias son *Ipf,* que codifica para las fimbrias polares largas, y también están los genes *agf,* que codifican para las fimbrias agregativas delgadas.

Luego de adheridas las bacterias, las células del borde en cepillo sufren reorganizaciones citoesqueléticas que las envuelven, las endocitan en vesículas, para facilitar la penetración y la invasión, mediante la endocitosis mediada por las bacterias.

Penetran la mucosa intestinal y la invaden al ser transportadas por los PMN. Esto provoca inflamación de la lámina propia, generalmente sin destruirla, presentando moco y sangre en las heces en algunos casos.

En el momento de la infección de las células eucariotas, *Salmonella* produce una serie de proteínas que se translocan desde el citoplasma bacteriano al interior de la célula del huésped, las que regulan la polimerización de los filamentos de actina, como forma de regular los movimientos de las salmonelas, formándose unos pseudopodos que engolfan la bacteria,internalizándola.

Por un mecanismo diferente al de las shigelas, que se multiplican en el interior de las células epiteliales, las salmonelas, incluida *Salmonella* Typhi, luego de ser captadas por las células epiteliales intestinales, se desplazan hacia la membrana basal sin multiplicarse y son liberadas hacia la lámina propia.

Dado que las células epiteliales no cumplen la función de un ambiente adecuado para el desarrollo de estas bacterias y su multiplicación, sino que funcionan como una barrera que debe ser atravesada, estas bacterias lo logran sin, aparente daño celular.

Esta diferencia en el grado de destrucción del epitelio colónico, con las shigellas, se diagnostica también por el test de Sereny. Para las shigellas y ECEI, el test es positivo, por la habilidad de producir ulceraciones en el epitelio de la córnea del cobayo o conejo y negativo para *Salmonella* y otros *E. coli*.

A medida que atraviesan la mucosa, para llegar a la lámina propia, con frecuencia ingresan al torrente circulatorio y pueden ser recuperadas tempranamente en hemocultivos, luego rápidamente son captadas por los fagocitos y no hay bacteriemia persistente.

S. Typhi y un serotipo de *Salmonella* Enteritidis son las excepciones, que parecen diseminarse en forma sistémica más frecuentemente, provocando infecciones sistémicas focales.

El daño en la mucosa intestinal de las no tifoideas, se debe a la propia respuesta inflamatoria, tal cual ocurre en la lámina propia.

Inducen una respuesta secretoria en el epitelio intestinal e inician el reclutamiento y la transmigración de neutrófilos en el interior de la luz intestinal.

De la capacidad de las salmonelas de sobrevivir y multiplicarse en el interior de los macrófagos, depende su supervivencia, su diseminación y potencial para generar enfermedad.

Si bien en el interior de los macrófagos las bacterias se encuentran protegidas de la inmunidad humoral, inducen muchos genes contra estas defensas.

De todos modos, como estos microorganismos no están adaptados para sobrevivir dentro de los fagocitos, rápidamente son eliminados y la diarrea es autolimitada.

Entre los microorganismos que translocan la mucosa intestinal, penetran en la mucosa, llegan a profundidad en el epitelio superficial y pasan a los vasos sanguíneos, dando así una invasión sistémica, se encuentran *Salmonella* Typhi*, Salmonella* Enteritidis*, Campylobacter* y *Yersinia*.

La inmunoglobulina A secretoria constituye el principal mecanismo de defensa local.

En *Salmonella, Shigella* y *Campylobacter* que pasan a la submucosa, el gran líquido que se produce se explica por la liberación, al agredir la célula, de citoquinas, como la IL8 que actúan sobre fibroblastos, PMN del corion y otras células que segregan IL1 y 3 que liberan prostaglandinas y leucotrienos que tienen acción secretoria. Acción en el metabolismo de la adenilato ciclasa, incrementando los niveles de AMPc que tiene como consecuencia final, la interrupción de la absorción de Na+ y el aumento de la secreción de Cl-, lo que lleva a una perdida de agua por parte de la célula, signos claros de una diarrea.

Una enterotoxina similar a la secretada por *Vibrio cholerae* y por ECET, estaría involucrada en este proceso.

El serotipo más frecuente causante de diarrea en nuestro país es actualmente *Salmonella* Enteritidis, seguida de *Salmonella* Typhimurium.

Si bien hay casos de diarrea disentérica, en América Latina es causa de 0.5 a 4% de los episodios diarreicos generalmente secretores.

La infección producida por *Salmonella* no tifoideas produce una gastroenteritis aguda autolimitada que no se distingue de la gastroenteritis producida por muchos otros patógenos bacterianos.

Se caracteriza por un ataque brusco que incluye náuseas, vómito, dolor abdominal, fiebre seguido de diarrea líquida mucosanguinolenta a veces, tras 24 a 48 hrs de haber ingerido el alimento o agua contaminada.

La deshidratación y el desequilibrio hidrosalino se presenta en las edades de los extremos de la vida.

La enfermedad se autolimita entre 3 a 5 días y las salmonelas se excretan por heces.

El examen microscópico de las heces puede mostrar neutrófilos pero raramente eritrocitos.

> *Campylobacter* spp.

Las bacterias llamadas *Campylobacter* son una de las principales causas de las enfermedades diarreicas de transmisión alimentaria del ser humano y las bacterias más comunes causantes de gastroenteritis en el mundo entero.

Estas bacterias por lo general tienen forma espiralada, de S o curva, o bien de bastón. Actualmente, el género *Campylobacter* comprende 17 especies y seis subespecies, de las cuales las más frecuentemente detectadas en enfermedades humanas son *C. jejuni* (subspecies *jejuni*) y *C. coli*. Otras especies como *C. lari* y *C. upsaliensis* también han sido aisladas en pacientes con enfermedades diarreicas, pero su notificación es menos frecuente.

La mayoría de las especies prefieren una atmósfera microaeróbica (que contenga entre un 3% y un 10% de oxígeno) para su crecimiento. Para algunas especies es más propicio un medio anaeróbico (que contenga poco o nada de oxígeno), aunque también pueden crecer en condiciones microaeróbicas.

Campylobacteriosis es la enfermedad diarreica causada por la infección por *Campylobacter*. Los primeros síntomas de la enfermedad suelen aparecer entre dos y cinco días después de la infección, pero el periodo puede oscilar entre uno y diez días.

La diarrea se presenta frecuentemente con presencia de sangre en las heces, dolor abdominal, fiebre, dolor de cabeza, náuseas y/o vómitos, y duran por lo general de tres a seis días.

Bacteriemia, hepatitis, pancreatitis y abortos se han observado con diverso grado de frecuencia. Entre las complicaciones posteriores a la infección figuran la artritis reactiva y trastornos neurológicos como el síndrome de Guillain-Barré.

La campylobacteriosis es una zoonosis, es decir una enfermedad transmitida al ser humano por los animales o por productos de origen animal por lo que la vía principal de transmisión son los alimentos.

Las especies de *Campylobacter* están ampliamente distribuidas en la mayoría de los animales de sangre caliente. Tienen prevalencia en los animales destinados al consumo como aves, vacunos, porcinos, ovinos, roedores, monos, moscas de potreros, avestruces y mariscos; y en los animales de compañía como perros y gatos. La transmisión de estas bacterias al hombre se realiza directamente por contacto o indirectamente a través de alimentos contaminados. La mayor parte de las veces, los animales muertos o la carne quedan contaminados por las heces durante el sacrificio. El agua o el hielo contaminados son también una fuente de infección.

Algunos casos ocurren tras el contacto con agua contaminada durante actividades recreativas.

En general en el mundo provocan más casos de diarrea que la *Salmonella* transmitida por los alimentos.

La cadena de transmisión nace probablemente en las aves zancudas migratorias que contaminan fuentes de agua y a diversos animales silvestres y domésticos. Más cercanos al hombre, las aves de corral y sus productos son las principales fuentes principales de contagio.

La transmisión transfusional es menos frecuente.

En los países en desarrollo, las infecciones por *Campylobacter* en menores de dos años son especialmente frecuentes, y a veces mortales. Debido a su elevada incidencia, así como a su duración y posibles secuelas, la diarrea por *Campylobacter* tiene gran importancia desde una perspectiva socioeconómica.

La enfermedad en animales es poco frecuente

Las especies de *Campylobacter* mueren por calor y la cocción a fondo de los alimentos, con lo que para prevenir las infecciones por *Campylobacter* hay que seguir las prácticas básicas de higiene alimentaria al preparar las comidas.

La amplia distribución de *Campylobacter* dificulta la elaboración de estrategias de control a lo largo de la cadena alimentaria. Sin embargo, en los países que han adoptado estrategias específicas para reducir la prevalencia de *Campylobacter* en las aves de corral vivas, se ha observado una reducción similar en los casos humanos.

Las especies termofílicas, son las asociadas a la diarrea infecciosa. La campylobacteriosis constituye una zoonosis, siendo los reservorios principales aves y cerdos.

Las especies *C. jejuni, C. coli* y *C. laridis* termofílicas, son productoras de diarrea.

La campilobacteriosis tiene distribución mundial. Las infecciones suelen ser leves pero pueden ser mortales en niños pequeños o en personas de edad o en inmunodeprimidos.

En general las especies asociadas a la enteritis producen una diarrea secretora que no requiere hospitalización. Se trata de una enteritis aguda en especial en niños de 1 a 4 años y en adultos jóvenes.

Puede infectar a personas sanas o con inmunocompromiso previo.

Dada la variación en la dosis infectiva, desde 200 bacterias (como las shigellas) a 10^6 se cree que lo que determina la dosis infectante es la susceptibilidad del huésped y/o la virulencia de la cepa.

Puede ser eliminada por la acidez gástrica, siendo ésta una importante barrera para evitar la infección. La excreción fecal de estas bacterias es abundante.

Son bacilos gramnegativos curvos espirilados con forma de "S" o alas de gaviota cuando se unen dos o más células. Miden de 0,2 µm de ancho por 0,5 a 5 µm de longitud y pueden perder la morfología típica y aparecer esferoidales en cultivos viejos.

Son móviles por un flagelo polar en uno o ambos extremos, flagelo que tiene una longitud superior en dos o tres veces al cuerpo bacteriano. La movilidad se da en movimiento de avance y retroceso o en tirabuzón.

Estas especies termofílicas *C. jejuni, C. coli* y *C. laridis* desarrollan en una atmósfera microaerofílica que contenga aproximadamente 5% de O_2 pero no en aerobiosis ni anaerobiosis. Desarrollan mejor a 42 ºC que a 35 ºC.

Las colonias pueden ser aplanadas, convexas, con bordes irregulares, tendiendo a formar velo, semejando gotas de rocío.

Las especies que nos importan en esta sección son catalasa y oxidasa positivas y no fermentan ni oxidan los hidratos de carbono.

Tienen una pared con LPS de tipo rugoso, lo que los hace sensible al suero humano normal a diferencia de *C. fetus,* cuyo LPS es liso y por ello resistente al suero.

Esta observación explica la escasa frecuencia de bacteriemia por *C. jejuni* en oposición a la frecuencia de bacteriemia por *C. fetus.*

Muchos de los mecanismos que vimos anteriormente, los encontramos en estas bacterias productoras de diarrea.

Tienen capacidad para adherirse a la mucosa intestinal, producir enterotoxinas, invadir y hasta de translocar la capa mucosa.

C. jejuni, el más involucrado en la EDA, pone en juego una serie de factores de virulencia en su desarrollo.

- Posee una enterotoxina citotónica muy similar a la LT de ECET y *V. cholerae,* que produce acumulación de AMPc y dos citotoxinas, tipo toxina shiga que se elaboran en bajo nivel.
- Un LPS de tipo rugoso con actividad endotóxica como todo bacilo gramnegativo.
- Proteínas flagelares fundamentales para la adherencia, entre sus principales determinantes de patogenicidad.

Una vez en la luz intestinal, la movilidad a través de su flagelo, le posibilita atravesar el moco y profundizarse en las criptas hasta llegar a las células blanco del intestino, mediante previa adherencia.

A partir de su adhesión se manifiesta o un mecanismo invasivo inflamatorio o un mecanismo secretorio o ambos.

Se afirma que más del 50 % de las cepas que provienen de diarreas inflamatorias son hemolíticas, citotóxicas e invasivas, produciendo a veces enterotoxinas y las que provienen de diarrea secretora son casi totalmente altamente adherentes y productoras de toxinas citotónicas.

Se cree que esta diferencia está más relacionada al estado previo del huésped. En huéspedes del mundo pobre, con alta contaminación microbiológica del ambiente, la diarrea se presenta como secretora y en el mundo desarrollado la diarrea, por ausencia de inmunidad previa, se presenta más severa, hemorrágica, inflamatoria.

El crecimiento de casos asintomáticos en el primer y segundo año de vida que se da en el mundo pobre, da cuenta de ello.

Se ha visto que los pacientes infectados adquieren inmunidad frente a los antígenos proteicos de pared y frente al LPS.

Los anticuerpos son del tipo IgA, IgM e IgG, los que persisten por varias semanas luego de formados.

La diarrea es generalmente autolimitada en 3 a 5 días y la frecuencia es similar o, incluso mayor en algunas regiones, a la diarrea producida por *Salmonella* o *Shigella.*

Cuando la diarrea es sanguinolenta e inflamatoria, aparecen neutrófilos, eosinófilos y células mononucleares.

En casos más severos hay predominio de lesiones anorrectales que llegan a ulceraciones tipo colitis ulcerosa.

La colitis infecciosa por esta bacteria es semejante a la producida por *Shigella, Salmonella* y *Clostridium difficile*, y se hace difícil de diferenciarlas.

Es fundamental implementar el diagnóstico de *Campylobacter* a fin de evitar la formación de estas lesiones tipo colitis ulcerosa.

Además de la enteritis, estas bacterias pueden producir otras enfermedades como colecistitis, adenitis mesentérica, apendicitis, infección urinaria, proctitis en homosexuales, peritonitis en pacientes en DPCA, meningitis, y otras infecciones.

También *C. jejuni* fue asociado al síndrome de Guillain Barré, al síndrome de Reiter y al SUH.

En alrededor del 30% de los pacientes con síndrome de Guillain Barré se ha documentado infección reciente por *C. jejuni*, lo que estaría asociado a que estos pacientes comparten gangliósidos semejantes a estructuras del LPS de la bacteria.

> *Vibrio cholerae*

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cólera es una infección intestinal aguda causada por la ingestión de alimentos o agua contaminados por la bacteria *Vibrio cholerae.* O1 u O139.

Alrededor del 75 % de las personas infectadas no desarrollan ningún síntoma, mientras que entre las personas que presentan síntomas, un 80% tiene una diarrea leve o moderada.

El cólera tiene un periodo de incubación corto, entre menos de un día y cinco días, y la bacteria produce una enterotoxina que causa una diarrea copiosa, indolora y acuosa que puede conducir con rapidez a una deshidratación grave y a la muerte si no se trata prontamente. La mayor parte de los pacientes sufren también vómitos.

La bacteria libera una toxina que causa aumento de la secreción de agua de las células en los intestinos, lo cual puede producir diarrea intensa.

El cólera ocurre en lugares con condiciones sanitarias deficientes, hacinamiento, guerra e inanición. Los lugares comunes para el cólera abarcan:

- África
- Asia
- India
- México
- América Central y del Sur

La OMS comunica recientemente, año 2013, que cada año se producen entre tres y cinco millones de casos de cólera en todo el mundo, de los cuales, 100000 terminan en muerte.

Las personas contraen la infección cuando ingieren agua o alimentos contaminados.

Un tipo de vibrio ha sido igualmente asociado con los mariscos, especialmente las ostras crudas.

Los factores de riesgo abarcan:

- La exposición a agua para beber contaminada o sin tratamiento
- Residir en áreas donde hay cólera o viajar hacia ellas

Vibrio cholerae, que produce esta enfermedad infecciosa aguda, de naturaleza tóxica, no invasiva y que tiene la capacidad de presentarse como epidemias masivas o endemias, tiene elevada mortalidad por la pérdida de líquidos, deshidratación, acidosis y shock.

Como consecuencia de las pandemias del siglo XIX, el cólera se ha diseminado por casi todo el mundo, en forma reiterada, siguiendo las rutas comerciales a partir del delta del Ganges en la India.

A lo largo de toda la historia escrita, el cólera (del griego *chole*, bilis) ha causado siete pandemias en diversas regiones del mundo, especialmente en Asia, Oriente Medio y Africa.

Desde 1961 emergió el biotipo El Tor como causa importante de pandemias, dando inicio a la séptima pandemia originada en un foco en Indonesia.

El cólera se ha difundido, afectando a muchos países, instalándose en el continente americano en forma epidémica a partir de 1991, lugar donde hacía mas de 100 años, no existía.

Desde Perú continuó la diseminación de la enfermedad hacia Bolivia, Argentina, Paraguay y muchos países más.

V. cholerae O1, biotipo clásico, fue el agente etiológico de las primeras seis pandemias.

Este microorganismo de alta patogenicidad y letalidad, se difunde rápidamente entre la población.

Se cree que la inmunización contraída, al infectarse amplios sectores de la población y la dificultad de la bacteria para sobrevivir en el ambiente exterior, fueron factores determinantes de la desaparición de este biotipo de casi todas las regiones que afectó.

En la séptima pandemia, aún en curso, el biotipo clásico fue reemplazado por El Tor, de menor virulencia, patogenicidad y letalidad, pero con mayor capacidad para sobrevivir en el medio ambiente.

Este hecho determina una propagación más lenta entre la población, mayor proporción de casos asintomáticos y período de eliminación fecal más prolongado, a pesar de que existen variaciones regionales, persistiendo por más tiempo en las regiones invadidas.

En el año 1992 apareció en Calcuta, India, una cepa distinta del serogrupo O1, que fuera identificada como *V cholerae* O139.

En esta región, el serogrupo O139 ha desplazado al *V. cholerae* El Tor serogrupo O1, (agente de la séptima pandemia). Este suceso no tiene antecedentes en la historia del cólera en el mundo.

Esta cepa toxigénica no aglutina con el antisuero O1 pero posee el potencial para causar epidemias y pandemias.

La bacteria

De acuerdo con el Manual de Determinaciones Bacteriologicas de Bergey, se ha establecido una familia taxonómica : *Vibrionaceae.*

Esta familia se diferencia de la *Enterobacteriaceae* por ser oxidasa positiva y presentar motilidad mediante flagelos polares.

La familia *Vibrionaceae* incluye dos géneros:

- Género *Vibrio*
- Género *Aeromonas*

El género Plesiomonas que pertenecía a la familia *Vibrionaceae*, ha sido incorporado a la familia *Vibrionaceae* luego de estudios de secuenciación de ARN ribosomal.

Dentro del género *Vibrio* se reconocen más de 20 especies, 10 de las cuales están asociadas con enfermedad en el hombre*:*

Vibrio cholerae: con más de setenta serogrupos, sólo serogrupo O1 y O139 pueden causar cólera.

La diferenciación en dos biotipos: *Vibrio cholerae* clásico y El Tor se realiza mediante pruebas bioquímicas.

Desde el punto de vista serológico ambos biotipos pueden subdividirse en los serotipos Ogawa, Inaba e Hikojima de acuerdo a antígenos comunes y constituyentes particulares.

Vibrio cholerae O1: agente etiológico del cólera epidémico, con sus dos biotipos. Son microorganismos que aglutinan con antisueros contra el Ag O1 y tiene su principal factor de virulencia: la enterotoxina colérica.

Vibrio cholerae O1 atípico, semejante al anterior pero no elaboran la enterotoxina colérica.

Vibrio cholerae no O1: incluye las cepas O2 a O138, no se diferencian del tipo O1, pero no aglutina con antisueros O1.

Vibrio cholerae O139 (Bengala) descubierto en La India como agente etiológico de la epidemia en ese país.

Vibrio parahaemolyticus: responsable de gastroenteritis asociado al consumo de productos marinos.

Vibrio vulnificus: asociado a septicemias primarias o secundarias a lesiones traumáticas expuestas a ambientes marinos.

Vibrio fluvialis: responsable, en escaso número de ocasiones de diarreas graves.

Vibrio mimicus: asociado a la diarrea post consumo de ostras.

Vibrio hollisae: asociado a la diarrea post consumo pescado crudo.

Vibrio furnissii: asociado a la gastroenteritis post consumo productos marinos.

Vibrio alginolyticus: además de diarrea asociada a consumo calamares en especial, también está asociado a infecciones óticas, de piel y septicemia.

Vibrio damsela: patógeno extraintestinal, responsable de infecciones de heridas.

Vibrio metschnikovii: recuperado, en forma accidental, de infecciones urinarias, heridas y peritonitis.

Los miembros de esta familia son bacilos gramnegativos rectos o curvados con flagelos polares. La mayoría son oxidasa positiva y todos utilizan la D-glucosa como única o principal fuente de carbono y de energía.

La mayoría son organismos acuáticos que se encuentran en agua dulce y salada.

V. cholerae mide entre 1,5 a 2 μ de longitud por 0,3 a 0,4 μ de ancho, es aerobio, pudiendo ser facultativo o anaerobio, posee ambos metabolismos: respiratorio y fermentativo.

No forma esporas, es de tamaño uniforme en cultivos puros y frescos, mostrando marcado pleomorfismo en cultivos viejos, llegando a observarse formas esféricas o filamentosas aisladas y en cadenas.

Un flagelo polar largo es el responsable del movimiento característico, vibrátil.

Desde el punto de vista nutricional, es poco exigente, se multiplica bien en agua de peptona y su temperatura óptima de crecimiento es de 35 a 37 ºC.

La capacidad de fermentar la glucosa la diferencia de las pseudomonas y la producción de la enzima citrocromo-oxidasa, de las enterobacterias.

La susceptibilidad de las especies de vibrios al compuesto O/129 (fosfato de 2,4 -diamino-6,7-diisopropilpteridina), la diferencia de las especies de *Aeromonas.*

Son organismos halotolerantes, con afinidad por el medio alcalino. Tienen marcada sensibilidad al ácido.

Si bien el género se considera halofílico, *V. cholerae* y otros vibrios no coléricos, pueden crecer en medios carentes de NaCl, característica ésta que se aprovecha para su aislamiento y caracterización, ya que muchas especies halofílicas no son capaces de crecer en medio sin sal.

Crecen bien a pH 7 hasta pH 9,5 a 10.

Sobrevive fuera del organismo por períodos prolongados de hasta siete días, especialmente si se trata de ambiente húmedo y templado.

En el agua sobrevive por horas, pero en agua dulce contaminada con heces, sobrevive hasta dos semanas; hasta un año en agua de mar y en el hielo hasta tres días.

También sobrevive hasta dos semanas en la superficie de frutas crudas y en ambientes refrigerados. En los utensilios, entre cuatro horas y dos días.

Además de ser extremadamente sensible a los ácidos, al cloro, no tolera pH inferior a 6, tampoco tolera la desecación, la pasteurización y la temperatura de cocción de los alimentos.

A 56 ºC por 15 minutos o a 70 ºC por 5 minutos es destruido.

Ya vimos que aunque *V. cholerae* O1 no es halofílico, su tolerancia a los álcalis es tan elevada, que se puede multiplicar en medios con salinidad de hasta concentraciones de cloruro muy elevadas hasta de 5 a 15 mM.

Estos hechos determinan que la bacteria tenga una sobrevida mejor en agua que en alimentos y que su supervivencia esté condicionada a la temperatura, pH, el grado de contaminación bacteriana, la cantidad de com-

puestos orgánicos presentes, la humedad osmótica y la concentración de sales y carbohidratos.

V. cholerae no se multiplica en el agua, pero dependiendo de todos los factores anteriormente mencionados, puede sobrevivir en ella hasta dos semanas.

Por todo lo expuesto, entre las condiciones que favorecen la diseminación de el cólera, se encuentran, el aumento de la temperatura media ambiental, aumento de los niveles de agua de los ríos y la salinidad óptima que se presenta como resultado del intercambio entre agua salada y dulce, en los deltas de los ríos y salinidad óptima en estuarios y nichos ecológicos, lugares éstos donde sobrevive *V. cholerae*.

V. cholerae se diferencia de otros vibrios, por su antígeno somático O (lipopolisacárido termoestable) y comparte antígenos termolábiles con otras especies de vibrios.

La especificidad serológica yace en el antígeno somático O, conociéndose ya 139 serogrupos.

Los anticuerpos contra el antígeno O, protegen a los animales de experimentación contra la enfermedad.

Las denominaciones "vibrios no aglutinantes" (NAG) y "vibrios no coléricos" (NCV) sirvieron para designar a aquellos vibrios que no aglutinan con el antisuero polivalente del grupo O1 únicamente, aunque bioquímicamente similares a la cepa que causa el cólera.

"Vibrios no aglutinantes" NAG y "vibrios no coléricos" NCV se integraron en una sola especie llamada *V. cholerae* no O1. Estos microorganismos pueden causar gastroenteritis, e infecciones extraintestinales como bacteriemia, otitis medias, infecciones de heridas y otras.

Con la aparición, de la nueva cepa de *V. cholerae* que no aglutina con el antisuero O1 y distinta de los 138 serogrupos existentes, responsable de brotes de cólera, y ya asignada a un nuevo serogrupo, O139, estas denominaciones fueron revisadas.

La serotipificación y la biotipificación de *V. cholerae,* se usan también, junto a técnicas más avanzadas, con fines epidemiológicos.

Actualmente el biotipo clásico quedó, confinado en el sur de Bangladesh, y el biotipo El Tor serotipo inaba, como responsable de la epidemia latinoamericana.

Se especula que el biotipo clásico y El Tor no derivan uno de otro sino de cepas no toxigénicas ambientales.

Los antígenos más relevantes son los antígenos O ó somáticos. Parece que todos los *V. cholerae* comparten un antígeno flagelar común.

Aunque existen muchos serogrupos, solo el O1 y O139 han demostrado su capacidad de causar epidemias.

En 1915, d'Herelle describió fagos en *V. cholerae*, llamados colerófagos y en 1933 Asheshov y colaboradores lograron también aislar varios tipos de fagos a los que denominó A, B, C, clasificándolos hasta la N.

Más tarde otros autores establecieron que el patrón de fagotipificación del biotipo clásico, difiere del correspondiente a El Tor, siendo además diferentes del patrón de los vibrios no O1.

La presencia en el *V. cholerae,* de diversos receptores para estos fagos, ya sea en la cadena O, en el núcleo del lipopolisacárido (LPS) y en proteínas de la membrana externa (OMPs), son valorados en el estudio por fagos.

El fago más utilizado en la diferenciación de cepas de *V. cholerae,* es el denominado fago O149, relacionado con la cepa Ogawa 154, biotipo clásico, que inhibe la síntesis de ADN y produce la lisis de todas las cepas de *V. cholerae* clásico.

El biotipo El Tor, escapa a esta acción lítica del fago, es resistente.

Diferencias en el contenido de carbohidratos en el lipopolisacárido de la pared celular de este biotipo, (menor contenido de hexosamina y ausencia de galactosamina) que alteran el receptor para el fago O149, son responsables de esta resistencia a la lisis.

La caracterización por fagos es usada para la diferenciación de biotipos y la vigilancia epidemiológica del desplazamiento de cepas entre las diferentes regiones.

La obtención de sondas para pruebas de hibridización de ADN, de los fagos que produce *V. cholerae* clásico NIH 41, denominados *V. cholerae* A1 y *V. cholerae* A2 (con acción lítica sobre cepas de el biotipo El Tor), ha aportado también a la diferenciación de las cepas El Tor del Golfo de México, de la australiana y de la pandemia americana.

Estos nuevos fagos, diferentes en: patrón de lisis, morfología (por microscopía electrónica), análisis de ADN por endonucleasas de restricción, especificidad serológica y perfil proteico (por PAGE), incrementaron la posibilidad de caracterización de cepas.

También estos nuevos fagos permitieron clarificar sobre si todas las cepas, tienen fuentes comunes y rutas comunes de transmisión; hechos éstos de gran valor en la formulación de estrategias de control y prevención.

Plásmidos que portan genes para la resistencia a tetraciclina y otros antimicrobianos, han sido descritos en *V. cholerae,* los que pueden ser adquiridos por un proceso de conjugación bacteriana o recombinación sexual, desde cepas de *Escherichia coli* u otras enterobacterias.

Factores que colaboran en la patogenia:

Motilidad

V. cholerae, con flagelo polar único, es extremadamente móvil.

Si bien la motilidad puede favorecer la habilidad de las cepas de vibrio de adherir y penetrar en la mucosa, alcanzar las microvellosidades intestinales y facilitar así la acción de la toxina, no es ella la única responsable de la adherencia bacteriana.

Otros factores contribuyen a la misma, como se refleja al observar que la pérdida de componentes de la membrana externa, esenciales para la virulencia, se traduce en pérdida de la misma y de la motilidad.

Proteínas flagelares

Por lo menos dos bien identificadas proteínas de la membrana externa, se asociaron con flagelos. Se sugiere que la pérdida de estas dos proteínas (mutantes no flageladas), condujo a la disminución de la letalidad y disminución de la adsorción de la mucosa intestinal en modelos animales.

Alta frecuencia de mutaciones espontáneas a variantes no móviles, que le confieren avirulencia a la bacteria, fue observada en el biotipo clásico de *V. cholerae*. Este hecho explicaría la declinación de *V. cholerae* clásico en las últimas apariciones por un mecanismo de selección. Organismos móviles serían seleccionados por su habilidad para colonizar el intestino y causar enfermedad, mientras que mutantes no móviles, no sobrevivirían.

Se especula que el biotipo El Tor sobrevive mejor en el ambiente, en parte debido a que no produce alta frecuencia de mutantes espontáneas a fenotipos no móviles.

Hemolisinas

Tanto el biotipo clásico y El Tor, fueron originalmente diferenciados, sobre la base de la producción de una hemolisina soluble, secretada al medio extracelular.

La diferenciación en biotipos no es necesaria para el control y tratamiento de la enfermedad.

El gen *hly*A, que codifica para la hemolisina Hly, potente toxina con actividad enterotóxica y citotóxica, ha sido caracterizado y secuenciado para ambos biotipos.

V. cholerae O1 El Tor hemolítico, ha sido relacionado inmunológicamente con aislados no O1 de *V. cholerae* productores de hemolisina.

Se sabe que *V. cholerae* produce una variedad de proteínas útiles para proporcionarle al microorganismo, sobrevivencia y crecimiento en el medio ambiente y en el huésped, como ToxR.

Un regulón, llamado "regulón ToxR" controlado por la proteína ToxR, (codificada por el gen *tox*R, descubierto por Taylor en 1987), regula coordinadamente, la expresión de otros genes que codifican factores de virulencia (más de 18 genes, incluídos *ctx*A y *ctx*B que codifica los segmentos A y B de la toxina del cólera (CT) *hly*A y el gen *tcp*A que codifica el pili TCP-(del inglés toxin corregulated pilus).

Factores de Colonización

V. cholerae tiene en su superficie una serie de estructuras que participan en la colonización de las células intestinales. Entre ellas están los lipopolisacáridos (antígeno O), los pili TCP, y el ACF (del inglés accesory colonization factor) y hemaglutininas.

El lipopolisacárido es inmunógeno, constituyente mayoritario de la superficie celular del vibrio. Está asociado al proceso infectante de la bacteria, al favorecer o impedir la expresión de proteínas involucradas en la adherencia, como fimbrias y adhesinas, en la superficie celular.

Los pilis TCP y ACF son estructuras poliméricas que actúan como factores accesorios en la colonización.

Los pilis y las hemaglutininas son además, antígenos inductores de respuestas protectoras.

Las hemaglutininas, son fibrillas, proteínas en la superficie del vibrio, que median en la adherencia de la bacteria a la célula intestinal y su colonización, al reconocer receptores en ella, generalmente carbohidratos. La expresión de la hemaglutinación, puede ser inhibida por azúcares.

No se encontró una clara asociación entre la expresión de las hemoaglutininas y el nivel de la toxina colérica.

El TCP, pili corregulado por la toxina ToxR, expresado por cepas del biotipo clásico (importante para la colonización en el intestino humano) ha sido descrito también en el biotipo El Tor, con pobre expresión en su su-

perficie celular. Se sugiere que en este biotipo, podría tener menor importancia en la adherencia y colonización intestinal.

Proteínas de membrana externa (OMPs)

Importantes en la colonización del huésped. Las OMPs son inmunogénicas, aunque su papel protector no ha sido aún bien dilucidado.

Proteasa

Esta proteasa, tiene destacada función, lisando el moco intestinal, al clivar importantes sustancias que funcionan como sus sustratos, como la mucina, fibronectina y lactoferrina.

Se involucra a esta proteasa también en la escición de la subunidad A de la toxina del cólera (CT) en los fragmentos A1 y A2.

La hemaglutinina-proteasa facilita el desprendimiento de *V. cholerae* del epitelio intestinal, por digestión-destrucción de receptores del huésped para diferentes adhesinas de la bacteria, lo que le permitiría diseminarse en el ambiente o en otros huéspedes.

Mucinasas y neuraminidasas

Ellas favorecen a la bacteria para atravesar la mucosa del intestino.

Bajo condiciones no óptimas para la expresión de la TC o del TCP, la habilidad de la neuraminidasa reside en mejorar la unión de la toxina al receptor al degradar a los gangliósidos a la forma de monosialosil, que es la forma más específica como receptor, favoreciendo el proceso patogénico.

Este mecanismo aporta a la comprensión del mayor número de infecciones asintomáticas que produce el biotipo El Tor, ya que estas cepas son menos productoras de neuraminidasa que el biotipo clásico.

Toxina IrgA

Muchas bacterias han desarrollado ingeniosos mecanismos para obtener la cantidad de este elemento que necesitan para su crecimiento, pero en

las infecciones por aquéllas que carecen de esos eficientes mecanismos de captación de hierro, la disminución de hierro sérico, puede tener un efecto protector, al limitar el desarrollo bacteriano **(Capítulo 1)**.

La patogenicidad de las infecciones bacterianas requiere frecuentemente de la interacción de diversos factores de virulencia.

Ya vimos anteriormente, como genes de virulencia son frecuentemente regulados de manera coordinada por locus regulatorios, que responden muchos de ellos a específicos estímulos ambientales. Entre ellos, la presencia de alto o bajo contenido de hierro, puede funcionar como una señal a la bacteria de que puede ingresar al huésped. La toxina IrgA, codificada por el gen *irg*A, regulada negativamente por la concentración de hierro en el ambiente, interviene en este proceso.

Los microorganismos pueden, por estos mecanismos reguladores, ahorrar energía y sustratos, mientras están fuera del huésped.

Enterotoxina del cólera (TC)

TC o colerágeno, es una enterotoxina termolábil, elaborada por *V. cholerae* O1, semejante antigénicamente, estructuralmente y en su mecanismo de acción, a la enterotoxina termolábil (LT) de ECET comentada antes.

-ZOT

ZOT (toxina de la zónula de oclusión) es una enterotoxina termolábil. En conejos se demostró que ZOT, al romper zonas intracelulares de uniones estrechas "zónula occludens", provoca un aumento de la permeabilidad de la mucosa intestinal (visto en otros patógenos como *Clostridium difficile*) con marcada disminución de la resistencia.

Este efecto deriva de un incremento de la conductancia tisular, que puede alterar las funciones de adsorción y secreción intestinal, con la consecuencia de efecto diarrogénico.

ZOT fue encontrada en ambos biotipos, clásico y El Tor.

ACE

Una tercera enterotoxina llamada ACE, es considerada también como un factor de virulencia.

Esta enterotoxina, codificada por el gen *ace*, causa secreción fluída en asa ligada de conejo y provoca un incremento de la diferencia de potencial a ambos lados de la membrana de las células epiteliales.

El incremento de la permeabilidad intestinal, inducida por ZOT, la compromete en síntomas como la fiebre, dolor abdominal, anorexia y o diarrea, y el aumento de la diferencia de potencial inducida por ACE, la compromete a ésta también en la diarrea.

La ocurrencia natural de cepas no enterotoxigénicas, carentes de *ace, zot* y *ctx,* no causan diarrea colérica en voluntarios.

Se denomina "cassette de virulencia" al segmento de cromosoma que contiene los genes *ctx*AB, *zot* y *ace tcp* y otros comprometidos en la virulencia.

Enterotoxina termoestable

La participación de otras enterotoxinas en la enfermedad colérica, ha sido sospechada, desde la década pasada, por Levine, entre otros, trabajando con voluntarios, en los que se provocó una diarrea moderada y benigna con la administración de cepas con específica deleción de los *ctx* genes encargados de codificar la TC.

La patogenia

El gen de la toxina del cólera es portado por el bacteriófago filamentoso CTX. Este fago se une a las fimbrias empleadas por la bacteria para colonizar el intestino del huésped, penetra en la bacteria e incorpora sus genes al cromosoma bacteriano.

Si bien *V. cholerae* no invade la mucosa, la adherencia bacteriana es crítica para el desarrollo de esta enfermedad, como ocurre en gran cantidad de enfermedades infecciosas.

Estos microorganismos reconocen a los tejidos a atacar, mediante sus adhesinas, llamadas también factores de colonización.

Es en el intestino delgado donde encuentra un ambiente alcalino, adecuado para la supervivencia y multiplicación.

Se adhiere y coloniza el intestino sin lesionar directamente la mucosa e inicia la producción de sus factores de virulencia solubles para lisar el moco intestinal y facilitar la adherencia, y entre ellos el colerágeno, la poderosa enterotoxina (TC), que va a desencadenar la larga secuencia de fenómenos que conducen a la enfermedad.

El resultado es que el colerágeno estimula la hipersecreción de agua y de iones cloruro a la vez que inhibe la absorción de iones de sodio.

Factores relacionados con la activación de otras proteínas, como las que intervienen en el transporte de Ca++, que a su vez activa proteínas intracelulares, podrían estar relacionados con la pérdida de fluidos.

El aumento de los niveles de AMPc en las células del intestino delgado, trae como consecuencia, la disminución de la absorción por las células vellositarias de Na+ y del Cl- acoplado neutralmente, y la secreción aumentada de Cl- por parte de las células crípticas, lo que determina un aumento de NaCl en la luz intestinal, que unido al agua, mediante fuerzas osmóticas, desencadena la excreción del líquido isotónico no absorbido, en forma de diarrea acuosa.

Está descrito además, la liberación en las células intestinales, de serotonina (5-hidroxitriptamina) y de péptido intestinal vasoactivo (VIP), por parte de la TC de cólera.

Sustancias que actúan sobre receptores intestinales del sistema nervioso central, intervendrían en la patogenia, al afectar la neurotransmisión a nivel intestinal y bloquear parcialmente la secreción inducida por la toxina.

El hecho de que, el efecto del aumento de AMPc sobre el enterocito, no interfiera con la absorción de Na+ acoplado a glucosa, da validez científica al uso de las sales de rehidratación, consideradas como uno de los más grandes progresos de la ciencia médica de los últimos tiempos. Ellas permiten promover el influjo de agua y electrolitos por la glucosa.

Para que todo este complejo mecanismo de daño se ponga en marcha y se desarrolle efectivamente, es necesario que los genes que codifican para la toxina colérica y el pilis TCP y los otros factores involucrados en la virulencia, estén regulados en forma coordinada, o sea que, por algún mecanismo de activación conjunta, se activen al mismo tiempo, a fin de que el microorganismo pueda disponer de sus productos e iniciar la acción patógena.

La ruta fecal- oral, es la más frecuente para la propagación.

La transmisión directa, persona a persona, no es una forma de transmisión habitual.

Individuos convalecientes y asintomáticos pueden excretar 10^2 a 10^5 *V. cholerae* por gramo de heces, mientras un caso activo puede excretar hasta 10^9 unidades viables.

La dosis infectante para producir enfermedad varía, no sólo en dependencia de los biotipos involucrados, sino también de factores, como la acidez gástrica y grado de inmunidad producido por infección previa con *V. cholerae* O1.

Mientras para el biotipo clásico, la dosis infectante es de 10 a 100 millones de unidades viables, para El Tor, la dosis requerida para la infección, es de 100.000 a un millón, la que disminuye si disminuye la acidez gástrica, llegando a 1000 bacterias, si es ingerida con bicarbonato de sodio.

El ciclo de transmisión comprende entonces, el excretor de vibriones, el medio ambiente y en especial el aprovisionamiento de agua.

La infección provoca un aumento de títulos de anticuerpos vibriocidas, aglutinantes y antitóxicos.

La infección aumenta también la resistencia a la reinfección, la que persiste por tiempo más prolongado contra el serotipo homólogo.

La endemicidad del cólera depende de la supervivencia de vibriones en el ecosistema acuático y la contaminación fecal de los suministros de agua, alimentos y zonas de pesca.

Ahora se sabe que:

- métodos mejorados de tratamiento en la mayoría de los casos por rehidratación oral, pueden reducir las tasas de letalidad de los casos de cólera hasta un 1%.
- portadores asintomáticos de la enfermedad son comunes.
- la inmunización más quimioprofilaxis y cordón sanitario son ineficaces para evitar o controlar los brotes.
- en los países en que el cólera está presente, pero no epidémico, causa menos del 5% de todos los casos de diarrea aguda.
- más del 90% de los casos de cólera son moderados y pueden ser difíciles de distinguir de otras enfermedades diarreicas agudas.
- cuidadosos hábitos en alimentos y bebidas, seguridad en la eliminación de excretas y aseo personal, son las más efectivas conductas individuales, para la reducción del riesgo de cólera.

V. cholerae O139 es un microorganismo distinto de los 138 existentes serogrupos de *V. cholerae*.

La infección por dicho microorganismo es generalmente adquirida por ingesta de agua o alimentos contaminados, y sus manifestaciones clínicas incluyen desde diarrea acuosa, vómitos y deshidratación con pérdida de agua y sales hasta cuadros de deshidratación grave, semejantes a los observados en el cólera clásico.

> **"En este caso documentamos la primera bacteriemia en la Argentina por V. cholerae O139 en una paciente en hemodiálisis crónica, sin que se observe diarrea u otra manifestación gastrointestinal. El foco epidemiológico de la infección no pudo ser determinado, ya que la paciente no estuvo expuesta a agua ni alimentos contaminados; Este hecho sugiere que las personas inmunes a V. cholerae O1, no lo son a V. cholerae O139, y que las vacunas existentes y experimentales contra el cólera, no inducirían inmunidad alguna contra esta nueva cepa".Primer caso asilado de V. cholerae O139 en nuestro país V. cholerae O139: Rev. argent. microbiol. vol.43 no.2 Ciudad Autónoma de Buenos Aires jun. 2011.**
>
> **Una de las características más prominentes, que diferencia a *V. cholerae* O139, de otros vibrios no-O1, es la habilidad para causar brotes explosivos de cólera con gran expansión.**
>
> **La similitud de los patrones clínicos de la enfermedad causada por esta cepa, con la causada por *V. cholerae* O1, llevó a llamarla "cólera".**

Las personas afectadas por estas nuevas epidemias corresponden a todos los grupos etáreos, en áreas donde la mayoría de la población, excepto los niños, tiene algún nivel de inmunidad adquirida contra el cólera.

Todo esto lleva a renovar los esfuerzos para la elaboración de vacunas efectivas contra este nuevo serogrupo y aumenta la preocupación, dado que puede ser un desencadenante de otras epidemias en el mundo.

La otra diferencia de este serogrupo O139, respecto a O1, la cápsula en cepas O139, sugiere potencial mecanismo invasivo en huésped susceptible, rol importante en la patogénesis, y en el diseño de estrategias vacunales. El material capsular fue extraído y purificado e identificado como un aminoazúcar.

V. cholerae O1 clásico y El Tor, nunca fueron aislados de sangre.

Cepas capsuladas O139, mostraron resistencia a la acción bactericida del suero humano normal, además de virulencia aumentada.

El serogrupo O139 está compuesto de una variedad de cepas con una diversidad genética toxigénicas y no toxigénicas con al menos nueve ribotipos diferentes.

Similitudes en la organización cromosomal de los genes *ctx* y *tcp*, así como la acción de estímulos ambientales para la expresión de esos genes, soportan la teoría de que la cepa O139 deriva de la cepa El Tor, la que habría adquirido, una variante del antígeno O. Tiene mayor cercanía genética con El Tor.

Se acepta que se originó de él adquiriendo características distintivas a partir de, probablemente, un vibrio no O1 mediante recombinación de material genético.

Estudios de las características estructurales del operón TC, en cepas O139, demostraron que, la mayoría de las cepas portan un mayor número de copias del gen TC, que cepas O1, lo que le conferiría mayor virulencia. Por lo menos diez copias del gen de TC, fueron reportadas y una mayor producción de toxina TC en pacientes con cólera causado por esta cepa, que en los enfermos por cepas O1, biotipo El Tor.

La diferencia serológica entre el serogrupo O139 y O1 y los otros no O1, llevó a considerar a este nuevo serogrupo, como una entidad diferente.

Sólo O139, de los serogrupos no O1, causa cólera, mientras éstos sólo causan, entre sus manifestaciones entéricas, una infección semejante a cólera.

El tratamiento de esta enfermedad es el mismo que se emplea en cólera producido por *V. cholerae* 01, rehidratación y drogas antimicrobianas, teniéndose en cuenta que *V. cholerae* O139 es sensible a tetraciclina, un antibiótico de elección en el cólera.

El diagnóstico de *V. cholerae* O139 en el laboratorio, se realiza con un antisuero específico O139.

La OMS da una serie de recomendaciones referidas a los alimentos.

La respuesta de la OMS

En asociación con otras partes interesadas, la OMS elabora políticas para seguir promoviendo la salubridad de los alimentos. Estas políticas abarcan la totalidad de la cadena alimentaria, desde la producción hasta al consumo, y requieren la aportación de diferentes tipos de competencias técnicas.

La OMS promueve el fortalecimiento de sistemas que garanticen la inocuidad de los alimentos, fomentando buenas prácticas de fabricación y

enseñando a minoristas y consumidores a manipular convenientemente los alimentos y evitar su contaminación. La educación del consumidor y la capacitación de quienes manipulan alimentos para que lo hagan de forma segura es una de las intervenciones más decisivas para prevenir las enfermedades de transmisión alimentaria.

Recomendaciones para el público y los viajeros

- En el folleto de la OMS *Guía para los viajeros sobre la inocuidad de los alimentos*se dan consejos prácticos para salvaguardar la salud durante los viajes.
- Cerciórese de que los alimentos estén bien cocidos y se mantengan calientes al servirlos.
- Evite el consumo de leche cruda y productos confeccionados con leche cruda. Beba únicamente leche pasteurizada o hervida.
- Evite el consumo de hielo a menos que se haya hecho con agua inocua.
- Cuando se dude de la inocuidad del agua de beber, hiérvala, y si no es posible, desinféctela con un agente desinfectante fiable de liberación lenta (habitualmente se consigue en farmacia).
- Lávese bien las manos con frecuencia, usando jabón, sobre todo después de haber tenido contacto con animales de compañía o animales de granja, o después de haber ir al baño.
- Lave cuidadosamente las frutas y verduras, especialmente si se van a consumir crudas. De ser posible, deben pelarse."(OMS nota descriptiva 255.OCT 2011).

La clínica y el tratamiento ■ mabel rinaldi

Para arribar a un diagnóstico y categorizar la gravedad de la diarrea se requiere confección de una cuidadosa historia clínica.

El interrogatorio, es el elemento clave para investigar las probables causas de diarrea:

- Consumo de antibióticos, sustancias tóxicas, alimentos y aguas contaminadas.
- Afección de otro miembro de la familia.
- Antecedentes de viajes, síntomas y tiempo de evolución.

- Características del huésped y del medio ambiente donde vive.

En la patogenía de la enfermedad diarreica, el medio ambiente es de fundamental importancia.

La disponibilidad de sanitario, la calidad y cantidad de agua disponible, la cantidad de personas que viven por vivienda, el acceso a la alimentación y a la adecuada conservación de los alimentos, son factores de importancia para la prevención de las enfermedades diarreicas.

Se considera que la diarrea es consecuencia de la pérdida de las condiciones básicas de salud.

La diarrea aguda es una enfermedad común en la infancia, grupo en el que causa importante morbilidad y mortalidad.

En nuestro país el 68-70% de todas las diarreas aparecen en primavera- verano y afectan principalmente a niños entre 1-48 meses.

El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de Argentina (SINAVE) informó 58 brotes de enfermedades transmitida por alimentos durante el año 2002 y casi un millón de casos de diarrea, a la vez que reportó aumentos significativos en la incidencia de casos de salmonelosis.

Un suministro adecuado de agua garantiza la satisfacción de las necesidades básicas de higiene, necesidades domésticas y promueve la mejoría de salud y del confort. Los grupos poblacionales más vulnerables son lo asentamientos sub- urbanos y rurales.

Las diarreas son una causa importante de morbilidad y mortalidad infantil en países en vías de desarrollo.

Los países que gestionan e invierten en la provisión de agua de su población disminuirán en forma paralela la relación de enfermedad/mortalidad infantil y mejorarán los indicadores de nutrición y actividad productiva.

La diarrea en los niños de corta edad y que pertenecen a las clases sociales pobres o empobrecidas, es la que se cobra la mayoría de las muertes cada año, independiente de los agentes etiológicos.

La principal vía de transmisión de las diarreas es la ruta fecal-oral (ingestión de agua o alimentos contaminados con materia fecal).

La medida de higiene básica más eficaz para el control y la prevención de la transmisión de la diarrea es el lavado de manos después de defecar y antes de la manipulación de alimentos.

Las medidas destinadas a la eliminación segura de los residuos sanitarios, eliminación y el tratamiento de la basura domiciliaria y de la descontaminación de los recursos hídricos, son tan importantes como la de contar con agua potable, para la disminución de las enfermedades diarreicas.

Disponibilidad de Agua potable y alcantarillado en nuestro país.

La accesibilidad al agua segura y de los servicios de saneamiento siguen siendo temas pendientes en muchas provincias, sobre todas en las provincias del Noroeste y Nordeste y del gran cinturón sub-urbano de Buenos Aires.

Protección de alimentos

El desarrollo de sistemas nacionales y provinciales de protección de alimentos en Argentina, es una prioridad dentro de la política del sector salud, que tiene como objetivo disminuir en forma eficiente el riesgo de adquisición y diseminación de enfermedades transmitidas por alimentos.

La población recibe información de cómo prevenir el riesgo de infección por alimentos y de la forma de adquisición de las enfermedades diarreicas a través de campañas educativas por medios masivos.

Características de las diarreas

Diarrea disentérica: este tipo de diarrea presenta reacción inflamatoria secundaria a la invasión de las bacterias a la mucosa intestinal principalmente, a nivel del íleon terminal y colon.

Las bacterias responsables de este cuadro, con mayor frecuencia, son: *Shigella* spp., *Escherichia coli* enteroinvasivo (ECEI), *Salmonella* spp.*, Yersinia enterocolitica y Campylobacter jejuni.*

Este tipo de diarrea se presenta como disentería aguda que se caracteriza por: eliminación de pequeña cantidades de materia fecal en la que se observa estrías de moco, pus y sangre.

Las deposiciones son frecuentes 7 a 10 (episodios diarios) que son precedidas de dolor abdominal (cólicos) y dolor con la defecación (tenesmo rectal).

Estos signos y síntomas se acompañan de fiebre, pero no de síntomas de deshidratación.

Este síndrome implica un proceso inflamatorio de la mucosa secundaria a la invasión de las bacterias y/o a su acción citotóxica.

Los cambios inflamatorios pueden comprometer en forma superficial (inflamación exudativa superficial), como ocurre en la infección por *Shigella* o ECEI, o bien comprometer toda la extensión de la mucosa colónica y en determinadas ocasiones, provocar la perforación de la pared intestinal.

Evolución: todas las diarreas infecciosas agudas son autolimitadas, excepto las formas septicémicas, colitis pseudo-membranosa, amebiana y enterocolitis necrotizante y las que se presentan en pacientes inmunocomprometidos.

Tratamiento: este tipo de diarrea se autolimita en 3 a 5 días por lo cual no deben ser tratadas con antibióticos, a excepción de algunos casos de shigelosis: niños menores de 2 años y en pacientes inmunosuprimidos o para interrumpir un brote familiar.

Shigelosis

La shigelosis es una infección intestinal descendente que se evidencia a pocas horas (usualmente menos de 72 horas con rango de 24 horas a 7 días) de la ingestión de alimentos o bebidas contaminadas aún con inóculo pequeño (10^2 UFC).

Estas comienzan a replicarse y durante esta etapa aparecen los síntomas y signos de la disentería: fiebre alta, malestar general, dolor abdominal (cólicos) y cefalea y en forma inicial eliminación de heces diarreicas.

Los micro-abscesos son ocasionados por la invasión bacteriana, los que confluyen entre sí y dan origen a las ulceraciones de la mucosa del colon.

En esta etapa, el paciente presenta urgencia defecatoria y tenesmo rectal con eliminación de pequeña cantidad de heces con estrías sanguinolentas y mucus.

A pesar del proceso inflamatorio intenso de la mucosa colónica además de la bacteriemia y su posterior diseminación, no es frecuente en pacientes no inmunocomprometidos.

Shigella puede ser causa de bacteriemia, sepsis y de cuadro severo de disentería hasta llegar a la perforación colónica, en neonatos o en niños y adultos inmunosuprimidos.

Las shigelas y particularmente *S. dysenteriae,* pueden ocasionar brotes intrafamiliar o bien institucional por la diseminación de persona a persona cuando no se observan las mínimas condiciones de higiene.

Generalmente son los niños, los más comprometidos.

El reservorio de *Shigella* es el hombre enfermo, quien tiene la capacidad de eliminar microorganismos por un mes aproximadamente.

La infección por *S. dysenteriae* tipo 1 está asociada con pérdida de proteína entérica, que contribuye a un incremento en la susceptibilidad a las infecciones secundarias. Esta cepa es poco frecuente en Argentina y se la asocia con SUH.

Las manifestaciones extraintestinales de la shigelosis son: cefalea, meningismo y en algunas ocasiones síndrome convulsivo especialmente en niños. Estos signos y síntomas son atribuidos a la neurotoxina.

Los pacientes también pueden presentar artritis similar a la observada en el Síndrome de de Reiter, que se presenta en 10% de los pacientes, a las dos a cinco semanas posteriores a la enfermedad disentérica.

Durante la disentería se puede evidenciar: conjuntivitis con cultivo positivo y esto representa auto-inoculación en las conjuntivas.

> Tratamiento

El tratamiento con antimicrobianos se recomienda en niños menores de 2 años, pacientes inmunosuprimidos y cuando se desee interrumpir un brote intrafamiliar.

Tratamiento en pacientes adultos:

- Ciprofloxacina 500 mg cada 12 horas por 3 días o bien levofloxacina 500 mg cada 24 horas por 3 días son buenas opciones.
- Ceftriaxona 2 gr única dosis.

Shigellosis en paciente pediátrico

- Ceftriaxona 50-100 mg en monodosis diaria por 3 días: azitromicina 500 mg en monodosis.

En pacientes inmunosuprimidos el tratamiento se debe extender a 7 días.

E. coli enteroinvasiva (ECEI) puede ocasionar un síndrome similar a la shigelosis.

El período de incubación es de 2 a 3 días después de la ingestión de alimentos o bebidas contaminadas.

Salmonelosis

Las infecciones por salmonelas afectan a los animales y al hombre.

La enterocolitis causada por *Salmonella* se caracteriza por: fiebre, dolor abdominal tipo cólico, diarrea que se inicia 8 a 48 horas después de la ingestión de alimentos o bebidas contaminadas.

La diarrea de los pacientes con salmonelosis, frecuentemente contiene un número moderado de leucocitos polimorfonucleares.

Aunque *Salmonella* Enteritidis predominantemente compromete la lámina propia de intestino delgado, se han reportado casos donde *Salmonella*Typhimurium puede causar colitis, criptitis y erosiones o ulceraciones de la mucosa, que resultan en la eliminación de heces sanguinolentas.

Los pacientes más susceptibles para el desarrollo de enfermedad grave son los niños desnutridos, inmunosuprimidos (SIDA, pacientes en tratamiento con inmunosupresores y quimioterápicos)

Las personas que se encuentran recibiendo medicamentos que bloquean la secreción gástrica y que como consecuencia se produce un aumento del pH gástrico, son marcadamente susceptibles a contraer infección por *Salmonella.*

Un pH acido gástrico es la primera barrera efectiva para contrarrestar la colonización y posterior proliferación bacteriana y por ello no se producirá la invasión intestinal.

Las salmonelas no tíficas producen en el hombre un amplio espectro de cuadros clínicos que incluyen las infecciones gastrointestinales sintomáticas y bacteriemia.

La mayoría de la infecciones se presentan en los meses de primavera y verano, los niños son los más frecuentemente afectados.

> Tratamiento

El tratamiento de elección en este tipo de diarrea es la administración de SHO.

Los antibióticos no están indicados en pacientes inmunocompetentes la infección que se autolimita en 3 a 5 días y por ser una condición que no pone en riesgo la vida.

La administración de antibiótico genera prolongación de excreción bacteriana y por lo tanto prolonga la condición de portador**.**

Los pacientes inmunocomprometidos, pacientes neonatos y niños menores en determinadas situaciones, requerirán de tratamiento antibiótico adecuado.

Campylobacter spp.

Campylobacter jejuni es responsable principal de diarrea a nivel mundial.

Se estima que se infectan dos a cuatro millones de personas cada año.

El grupo etareo más frecuentemente comprometido son los niños, adolescentes y adultos jóvenes.

Una vez dentro del aparato digestivo humano, el *Campylobacter jejuni* infecta y ataca el revestimiento de intestinos grueso y delgado.

Además de esta especie, existen otras que pueden causar enfermedades.

Campylobacter fetus afecta principalmente a neonatos y a personas con inumunocompromiso, en quienes este tipo de infección de es gran relevancia y por lo tanto requieren un rápido diagnóstico y tratamiento antibiótico adecuado.

Además del tracto gastrointestinal, *Campylobacter jejuni* también puede afectar a otros órganos y sistemas, puede ocasionar bacteriemia especialmente en neonatos y ancianos y en aquellos con enfermedades subyacentes o bien que reciban tratamiento inmunosupresor.

Dependiendo del paciente, este trastorno puede resolverse sin síntomas o bien puede afectar a una serie de órganos y comprometer la vida del paciente.

En casos aislados, puede aparecer, una forma inusual de artritis, después de la infección por *Campylobacter*.

Algunos informes indican una relación de esta infección bacteriana con la posibilidad de desencadenar, por fenómenos inmunológico, el síndrome de Guillan-Barre.

Los principales síntomas de infección por *Campylobacter jejuni* son: fiebre, dolor abdominal (cólicos) y diarrea, que generalmente es leve, aunque a veces puede ser grave.

El inicio de los síntomas usualmente se resuelve en 2 a 5 días (rango de 1 a 10 días).

La diarrea, cuando adquiere severidad, ocasiona deshidratación severa que deriva en insuficiencia pre-renal y renal.

Los niños y ancianos presentan somnolencia, abulia y al examen físico evidencian: piel y mucosas con humedad disminuida, fiebre, exoftalmia y déficit del volumen urinario.

La diarrea inicialmente es líquida, luego presenta estrías de sangre y/o muco. A veces el dolor abdominal es el síntoma jerárquico, más que la frecuencia y características de la diarrea.

La infección podrá confundirse con enfermedades que son causas de abdomen agudo, como apendicitis y pancreatitis.

Complicaciones como ser, bacteriemia, hepatitis, pancreatitis y aborto han sido reportados con varios grados de severidad.

Los síntomas suelen aparecer de uno a siete días después de la ingestión de la bacteria.

La diarrea se detiene generalmente en un período de dos a cinco días, aún sin tratamiento antibiótico.

La recuperación completa suele demorar aproximadamente una semana.

Aproximadamente en el 20% de los casos, la diarrea dura más tiempo (tres a cuatro semanas) o es recurrente.

La mayoría de los niños con infecciones por *Campylobacter* spp., se recuperan sin tomar antibiótico, ocasionalmente se podrá decidir la prescripción de eritromicina, tetraciclina y eventualmente quinolonas.

El tratamiento se considerara especialmente en niños muy pequeños o en los que presenten síntomas graves.

> Tratamiento

Paciente adulto: Azitromicina 500 mg cada 24 hs x 72 hs
Niño: Azitromicina 30 mg / kg en monodosis

Alternativa eritromicina: 12,5/kg mg cada 6 hs x 72 h

Doxiciclina suspensión oral 2-4 mg /kg e (La doxiciclina es segura para el tratamiento del cólera en niños en la dosis recomendada)

La Organización Panamericana de la Salud recomienda el uso de doxiciclina como una elección de segunda línea.

E. coli enterohemorrágico (ECEH)

E. coli enterohemorrágica causa diarrea sanguinolenta y (SUH) por su capacidad de producir verotoxina (Shiga- Like-Toxin).

ECEH causa diarrea sanguinolenta en primavera-verano y generalmente se presenta en brotes en determinadas regiones.

La enfermedad es secundaria a la unión de ECEH al epitelio de intestino y a la producción y posterior liberación de la verotoxina.

EHEC destruye las células epiteliales, causa necrosis vascular y edema del tracto intestinal.

Se estima que 5 a 8% de los pacientes que presentan este tipo de infección intestinal desarrollarán SUH.

El diagnóstico es sugerido por los hallazgos clínicos y es confirmado por la detección de ECEH productor de la verotoxina en el laboratorio.

El SUH por lo general tiene una estacionalidad primavera verano.

En estos meses se presenta con un porcentaje alto de casos.

En Argentina se reportan casos a lo largo de todo el año.

El grupo etáreo más frecuentemente afectados son los menores de 5 años.

El SUH se presenta en forma inicial con diarrea acuosa, que progresa a diarrea sanguinolenta en los días sucesivos (72 horas).

El SUH se caracteriza por insuficiencia renal aguda, diarrea sanguinolenta, dolor abdominal y fiebre. En laboratorio se observa trombocitopenia, complejos inmunes circulantes y anemia hemolítica, aumento de urea y creatinina y aumento marcado de proteína C reactiva.

Las complicaciones no renales incluyen a la colitis isquémica, estenosis colónica y pancreatitis persistente con diabetes.

Otras alteraciones reportadas son la reacción leucemoide y colitis pseudo-membranosa que son secundarias a complejo inmune circulante en ausencia de bacteriemia demostrable.

Aún no se dispone de tratamientos efectivos del SUH o de estrategias que disminuyan el riesgo de progresión a la insuficiencia renal.

Se postula que la liberación de toxina inicia una cascada de factores pro coagulantes, factores que favorecen a la injuria tubular renal; Por ello se sostiene que cuando mayor es la liberación de toxina, mayor es la liberación de agentes protrombóticos y que este disturbio en la coagulación lleva al desarrollo de insuficiencia renal y finalmente a la sepsis. En los últimos años, se sugiere que la cantidad de hidratación parenteral que recibe el paciente a fin de corregir la deshidratación, antes del SUH, parece ser un factor de protección contra el desarrollo del fallo renal.

La obstrucción intestinal se presenta en un 3% de los pacientes y es un signo de mal pronóstico y no infrecuentemente asociado con muerte o al desarrollo de SUH.

> Tratamiento

Con respecto al tratamiento antimicrobiano se indica **la no administración** de los mismos, por favorecer al desarrollo de SUH, por muerte masiva de las bacterias y posterior gran liberación de la verotoxina.

Diareas enterotoxigénicas

Presentan inicio agudo con deposiciones líquidas, a veces precedidas por vómitos y dolor abdominal (cólicos).

Estas diarreas pueden ocasionar depleción hídrica y de sales (principalmente sodio, potasio y magnesio).

Dependiendo de la gravedad de la deshidratación, requerirán hidratación por consultorio externo o en internación.

Estas diarreas se autolimitan. No se modifican con tratamientos con antimicrobianos ni con antidiarreicos.

> Tratamiento

El objetivo principal es la reposición de líquidos y electrolitos en caso leves y moderados con Sales de Hidratación Oral (SHO) por vía oral (V.O) y en casos más severos, la reposición de líquidos se hará por vía intravenosa (IV).

> Tratamiento en el hogar

Después de un examen médico, la mayoría de los niños con infecciones entéricas reciben tratamiento en domicilio, especialmente si no existen signos importantes de deshidratación.

Los pacientes deben beber mucho líquido.

Mientras dure la diarrea, deben ser controlados para detectar señales de deshidratación.

Los niños con diarrea que no estén deshidratados, deben continuar comiendo normalmente y aumentar la ingesta de líquido (evitar los jugos de frutas y las gaseosas).

Si el niño está deshidratado, deberá ingerir una solución oral de rehidratación (Pedialyte) durante aproximadamente 4 horas para corregir la deshidratación y continuar luego comiendo normalmente.

Los niños que toman leche materna deberían continuar haciéndolo sin interrupción.

Cólera

Al igual que en todas las enfermedades diarreicas de origen bacteriano y viral, el cólera representa un sistema de sanidad básico deficiente.

> Cólera en América

En el año 1997 el boletín epidemiológico de la Organización Panamericana de Salud (OPS) informó que 17 países de América informaron un total de 24.642 casos de cólera y 350 muertos ocasionadas por *Vibrio cholerae.*

Argentina reportó entre los años 1991-1996 4.184 casos de los cuales murieron 60 personas.

En febrero de 1996 se presentó una epidemia en la provincia de Salta con 422 casos y 5 muertos.

En octubre de 1996 se notifico otro brote que aumentó el número de pacientes infectados a 474.

En 1997 se notificó 405 casos de cólera, de los cuales el 95% provenían de las zonas fronterizas con Bolivia de Salta y Jujuy.

Según informe del SINAVE la última epidemia de cólera que padeció Argentina se inició en 1992, y finalizó en 1999. Se notificaron un total de 4.834 casos, el último de ellos en la provincia de Santa Fe.

La epidemia tuvo un comportamiento estacional y presentó marcados incrementos con los meses estivales.

La mayoría de los casos ocurrieron en la región noroeste. No se reportaron casos de cólera entre 2000 y 2003 y la investigación de casos sospechosos se mantiene en todo el país.

La infección por el *Vibrio cholerae* no otorga inmunidad duradera, sí brinda protección para el mismo biotipo. No existe inmunidad cruzada entre las distintas cepas y biotipos.

El cólera, una enfermedad diarreica aguda, provocada por una infección intestinal por *Vibrio cholerae*, es generalmente una infección benigna.

El paciente puede ser asintomático o presentar síntomas y signos de enfermedad moderada, pero a veces, puede ser grave.

Se estima que una de cada 20 personas infectadas, puede desarrollar una forma grave de la enfermedad, caracterizada por diarrea acuosa profusa, vómitos y entumecimiento de los miembros inferiores. En esta forma de presentación, la pérdida rápida de líquidos y electrolitos corporales lleva a la deshidratación y a la postración.

El cólera sin tratamiento adecuado, puede llevar a la muerte en cuestión horas, en la forma grave de la enfermedad.

Presenta un periodo de incubación abarca desde horas hasta 5 días.

La presentación es de inicio abrupto donde se pone de manifiesto, el aumento del peristaltismo abdominal, seguido de diarrea acuosa.

Las deposiciones aumentan en forma progresiva, son de gran fluidez hasta adquirir aspecto de agua sucia de color blanquecina (agua de arroz).

Las deposiciones liquidas son de grandes volúmenes (300-900 ml) y frecuentes.

La diarrea ocasiona gran pérdida de líquidos y de electrolitos (sodio, potasio y magnesio).

El paciente además puede presentar vómitos y dolor abdominal de tipo cólico. El paciente se encuentra siempre afebril, o bien dependiendo del grado de deshidratación, se presentará con disminución de la temperatura.

El cólera tiene una forma de presentación grave que ocurre en un 10% de la población enferma.

En el cólera grave, la deshidratación es superior al 10% y se presenta en pocas horas desde el inicio de la enfermedad.

El shock hipovolémico seguido de muerte, es la regla, si no se administra tratamiento hidratante adecuado.

El cuadro clínico se caracteriza por pérdida de la humedad cutánea y de las mucosas, evidenciada por enoftalmia y signo del pliegue positivo.

El paciente se torna asténico, letárgico, presenta taquicardia, hipotensión, disminución del volumen urinario y posteriormente presenta colapso circulatorio donde la presión arterial y el pulso son imperceptibles.

Las complicaciones frecuentes son: hipokalemia, hipomagnesemia, hipocloremia, acidosis metabólica, arritmia cardíaca, insuficiencia renal.

> Tratamiento

Hidratación: el reconocimiento temprano de la deshidratación y del oportuno y adecuado tratamiento determina la evolución y pronóstico del cólera.

El tratamiento tiene como pilar fundamental a la hidratación, que permite la reposición adecuada y oportuna de los líquidos y sales expoliados con la diarrea.

Los pacientes con formas leves y moderadas de deshidratación, pueden ser tratados con soluciones rehidratantes administradas por vía oral.

La solución de SHO, está disponible y se usa mundialmente para el tratamiento de la diarrea.

Las formas graves del cólera requieren la restitución de los líquidos y electrolitos por vía intravenosa.

Con el tratamiento oportuno y adecuado de hidratación, la mortalidad es 1 a 2% de los casos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y UNICEF consideran que el tratamiento ideal para la prevención y corrección del déficit de líquidos y electrolitos ocasionada por las diarreas de gravedades leves, moderadas y graves sin shock, es la utilización de las SHO.

La utilización de SHO puede ser aplicada a niños y adultos independientes de la edad y en deshidratación causada por diarrea de cualquier etiología.

Se considera a la SHO como el avance médico más importante del siglo por ser una de las intervenciones más impactante en salvar vidas y de bajo costo que se traduce en fácil accesibilidad en las poblaciones con menores recursos económicos.

La SHO es fácil de preparar, administrar y dosificar.

Es efectiva como única medida para hidratar en 90-95% de los pacientes deshidratados.

Es efectiva para reducir la morbilidad y mortalidad por diarrea y disminuye en forma significativa la hospitalización de los pacientes.

Preparación de la SHO

Diluir 1 sobre en un litro de agua hervida y previamente enfriada mezclando cuidadosamente antes de su utilización. Se la puede conservar 24 horas a temperatura ambiente y 48 horas refrigeradas.

Plan terapéutico

El plan terapéutico se clasifica considerando el estado de hidratación que presenta el paciente en el momento de la consulta.

Plan A se aplica a los pacientes que no evidencian signos de deshidratación. Plan B se aplica a los pacientes que evidencian deshidratación leve a moderada.

Plan C se administra en pacientes deshidratados graves que requieren internación**.**

Plan A- Paciente normohidratado.
Prevención de la deshidratación. Manejo ambulatorio.

- Indique a la madre que ofrezca más líquidos de lo usual (no infusiones caseras, jugos y gaseosas). La alimentación debe ser continuada.
- Eduque a la madre para que identifique los signos de deshidratación.
- Promueva el ofrecimiento de SHO luego de cada deposición liquida y o vómitos.
- Eduque a la madre sobre el lavado de manos antes de la preparación de bebida y alimentos, luego de la higiene y del cambio de pañales y de la forma de la eliminación adecuada de los pañales utilizados.

Plan B- Tratamiento en deshidratación leve y moderada.
Manejo ambulatorio.

Ofrecer SHO a 20 ml/kg, cada 20 a 30', hasta lograr la corrección de la deshidratación.

Si el niño vomita, espere 10' y reinicie la administración de SHO con pequeñas cantidades.

Instruya a la madre la utilización de utensilios adecuados para la administración y para la dosificación de la cantidad utilizada.

Explique cómo seguir con Plan A, luego de la normohidratación.

Plan C- Paciente deshidratado grave sin shock.
Requiere internación.

Inicie tratamiento oral con SHO (igual a del plan B).

Indicaciones de sonda nasogástrica (SNG)

Presencia de vómitos (más de 4 veces en 1 hora)
Si no toma la solución.
Falta de madre o acompañante.

1. Administrar la SHO por gravedad, a 20 ml/kg, cada 20 minutos, con jeringa.
2. Si vomita, iniciar gastroclisis a 5 macrogotas/ kg/' (15ml/kg/hora), durante 30 minutos.
3. Si tolera: 20 macrogotas/kg/' (60 ml/kg/hora).

Fracaso de hidratación oral

- Control inadecuado.
- Persistencia o progresión de los signos clínicos de deshidratación
- Pérdidas mayores a las aportadas
- Vómitos incoercibles
- Distensión abdominal importante
- Persistencia de signos de deshidratación, luego de 4 a 6 horas de iniciado el tratamiento de hidratación oral.

Los pacientes que presenten signos clínicos de shock, íleo, alteraciones del sensorio y deshidratación grave con shock, **no son candidatos para la utilización de SHO.**

Los antibióticos acortan el curso de la enfermedad y la gravedad de la misma, pero es un recurso terapéutico complementario a la reposición de líquidos y sales.

Tratamiento antimicrobiano

El tratamiento antibiótico se utiliza con el objetivo de interrumpir la cadena de transmisión de la infección.

Los antimicrobianos utilizados son:

> **El tratamiento antimicrobiano está indicado solo en determinadas circunstancias: pacientes inmunosuprimidos, pacientes neonatos, niños menores de 2 años, interrupción de brote epidemiológicos y en pacientes con diarreas de más de 72 hs de evolución y con gran repercusión del estado general y en paciente con diagnóstico de cólera, diarrea por campylobacter spp y shigellosis.**

Paciente adulto: doxiciclina (droga de elección) 100mg c/12 horas por 3 días o bien 300 mg en monodosis.

Tratamiento alternativo: ciprofloxacina 500 mg cada 12 horas x 72 horas.

Niños: Azitromicina 20 mg /kg en monodosis.

Alternativa: eritromicina 12,5/kg mg cada 6 hs x 72 h.

Doxiciclina suspensión oral 2-4 mg /kg.

Mujeres embarazadas: Mujer embarazada: Azitromicina 1 g en monodosis

Tratamiento alternativo: eritromicina 500 mg cada 6 hs por 72 hs.

El laboratorio ■ patricia oviedo

El diagnóstico microbiológico en enfermedades diarreicas infecciosas surge a partir de la identificación de un problema de control clínico o epidemiológico que hace necesaria la obtención de diversos tipos de muestra de

materia fecal (MF). Estas muestras pueden ser obtenidas sobre MF recién emitida o bien, mediante hisopado anal o rectal.

El proceso comienza por proveer las indicaciones al paciente para la recolección de las muestras solicitando, la mayor cantidad de datos posibles: nombre, edad, signos y síntomas al momento de la toma de muestra (deshidratación, desnutrición, fiebre, vómitos), si existe tratamiento antimicrobiano previo, etc. Además es necesario contar con otros datos de valor epidemiológico, tales como procedencia del paciente, si posee infraestructura para el tratamiento de excretas y residuos, condición de ambulatorio o no, y la calidad del agua de consumo en la zona.

Un aspecto importante a tener en cuenta, es la preparación previa de materiales e insumos, tanto para la obtención de las muestras como para la adecuada conservación y transporte, según la naturaleza de las mismas.

Una vez obtenidos los resultados, el proceso concluye con la generación de un informe destinado al médico tratante o bien a autoridades sanitarias que lo requieran, los que serán utilizados para tomar decisiones clinicoepidemiológicas y/o para la adecuación de tratamientos antimicrobianos. Es muy importante que este informe sea remitido en tiempo y forma, tomando en consideración la urgencia que revista cada caso.

Cuando el laboratorio no cuente con la metodología necesaria para el diagnóstico, se debe recurrir a los Centros de Referencia.

Aspectos importantes para la obtención, conservación y transporte de muestras

La muestra óptima (MF) recién emitida, dentro de los 5 a 7 días de la enfermedad, representativa en calidad y cantidad, obtenida por deposición espontánea**.**

Se recolectará la muestra en frasco estéril, sin conservantes. Entre las indicaciones al paciente, se recomendará la no ingesta de laxantes.

La obtención deberá realizarse en la primera fase de la enfermedad y, en lo posible, antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano.

En la práctica, cuando el envío de la muestra al laboratorio requiera de tiempo prolongado (más de 3 horas), se remitirá en un medio de transporte, y se tomará las precauciones de transporte refrigerado, sin congelar.

Si entre la obtención y el procesamiento de las muestras existiera un lapso mayor a tres horas, se tomará una pequeña cantidad de muestra mediante la inserción de un hisopo en las heces (hisopado fecal), haciéndolo

girar, e introduciéndolo luego en un medio de transporte en las condiciones antes señaladas.

Una vez en el laboratorio se las conservará en heladera entre 4°C y 8ºC, hasta su procesamiento. No deberán congelarse.

Cuando se sospecha que la infección es causada por microorganismos que invaden la mucosa del intestino bajo (por ej. *Shigella* spp.), es preferible tomar hisopados rectales ya que estos se recogen restregando la mucosa intestinal y será importante realizar la siembra de inmediato.

Si están presentes fragmentos de mucosidades o epitelio, también deberán transferirse al medio de transporte.

Características macroscópicas de la MF:

El análisis de la muestra comienza por la observación macroscópica de la MF. En ese sentido, se deberán registrar las características de la muestra: color, consistencia (forme, diarreica, acuosa, pastosa, líquida, semi-líquida) y la presencia de elementos tales como sangre macroscópica, mucus o pus.

Examen microscópico de la MF:

El exámen en fresco, consiste en observar al microscopio en aumento de 400X entre porta y cubreobjeto la presencia de leucocitos, hematíes, mucus y/o parásitos en una suspensión de MF con solución fisiológica (SF), o agua destilada estéril.

Se considera que una muestra presenta respuesta inflamatoria positiva cuando presenta en promedio, un leucocito o más por campo, después de observar al menos 20 campos en un aumento 400X.

Siembra en medios primarios de aislamiento:

Para la siembra de MF en medios de alta selectividad, se usará un inóculo denso (tres ansadas), y para medios de baja selectividad, se empleará un inóculo ligero (1 ansada).

Una manera de homogeneizar la muestra es suspender las heces en 1-2 ml de SF estéril, cuando se trate de MF forme. Las heces líquidas no necesitan solución salina.

Existe asociación entre un mayor inóculo de enteropatogenos y las zonas de MF en donde se observen macroscópicamente mucus, sangre y/o pus, por lo que es indispensable identificar y proceder a levantar con el ansa estas zonas para su posterior siembra.

Procedimientos para la identificación de enteropátogenos

> *Escherichia coli* diarrogénicas

Se consideran *Escherichia coli* diarrogénicas, a aquellas cepas involucradas en infecciones del tracto gastrointestinal, que utilizan factores de virulencia específicos, causando diarreas líquidas, hemorrágicas, disentéricas, de acuerdo al modelo patógenico asociado a las mismas.

En el proceso de identificación en el laboratorio podemos clasificar las seis categorías de *Escherichia coli* diarrogénicas

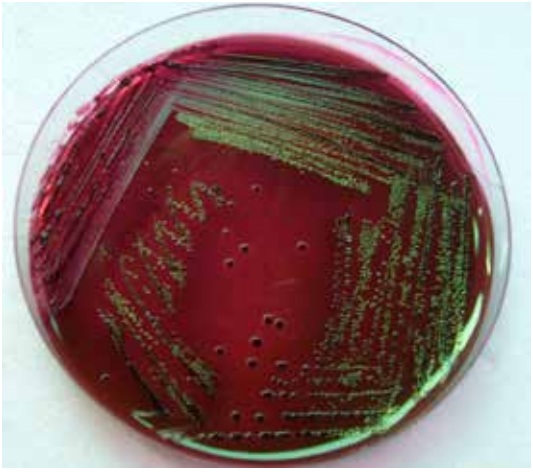
- De acuerdo a las características microscópicas (diferencia en sus patrones de adherencia a la superficie de las células de cultivo celular).
  * ECEP: Adherencia localizada (LA)
  * ECEA: Adherencia Enteroagregativa (Eag)
  * ECED: Adherencia Difusa (AD)
- De acuerdo a las características macroscópicas de la MF
  * ECET: Líquida, semilíquida, acuosa.
  * ECEI: Pus, abundante mucus, estrias de sangre.
  * ECEH: Con sangre y con escasos detritus celulares.

Identificación de ECEP, ECEA y ECED

Sembrar para aislamiento una placa de agar Eosina-Azul de Metileno (EMB) u otro agar lactosado (CLDE, MacConkey, u otro). Incubar 24 hs a 35ºC.

Observar las colonias registrando sus características.

Seleccionar 5 colonias fermentadoras de lactosa y transferir cada una de ellas a estrías de Agar Nutritivo (AN). Incubar 24 hs a 35ºC.



Escherichia coli en EMB.

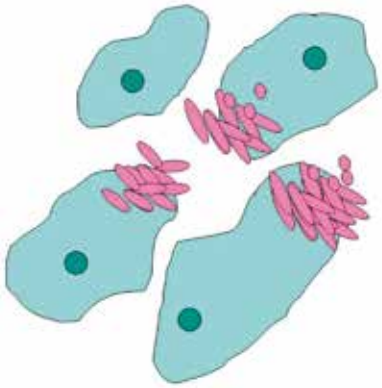
Realizar tipificación mínima: Indol- Rojo de Metilo-VogesProskauer-Citrato (IMVIC).

Seleccionar las colonias positivas para *E. coli* según IMVIC, para continuar el estudio.

Una vez realizada la identificación bioquímica, para conferir su rol etiológico, la bacteria debe ser caracterizada según la categoría a la que pertenece.

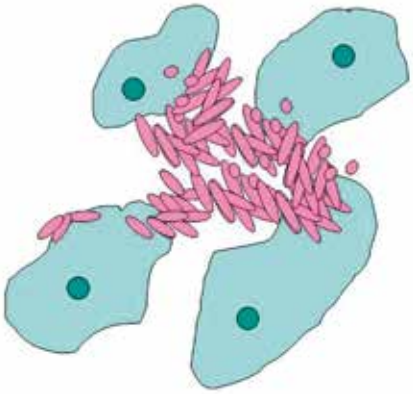
Según el patrón de adhesión a la superficie en diversos cultivos celulares, se pueden distinguir:

Adherencia Localizada (LA): aquella en que la bacteria forma grumos que se adhieren a las superficies de las célulasHeLa o Hep 2, utilizan este patrón las categorías ECEP, ECEH.



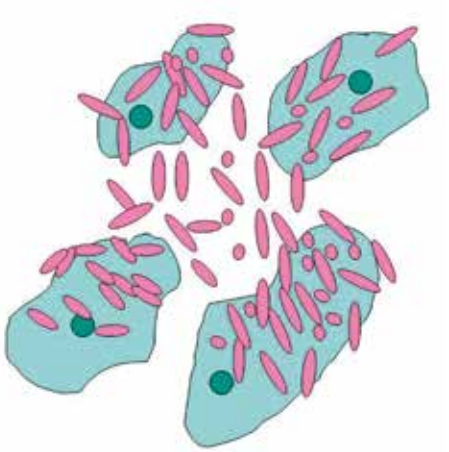
Representación esquemática de adherencia localizada en cultivos celulares.

Adherencia Difusa (AD): presenta una adhesión uniforme sobre toda la superficie celular, a ésta categoría pertenece ECED.



Representación esquemática de adherencia difusa en cultivos celulares.

Adherencia Enteroagregativa (Eag): propia de cepas que forman cadenas uniendo grumos o paquetes. ECEA posee este modelo de adhesión a los cultivos celulares.



Representación esquemática de adherencia agregativa en cultivos celulares.

Identificación de ECET

Colonias lactosas positivas provenientes de medios de cultivos primarios como EMB o Mac Conkey, con tipificación bioquímica compatible con *Escherichia coli*, deberán demostrar su pertenencia a esta categoría demostrando la presencia de la toxina mediante los métodos que se mencionan a continuación.

De las estrías de AN- realizar, según técnica:

Métodos "in vivo"

- asa ligada de intestino de conejo.
- test del ratón lactante.

Métodos "in vitro"

- ELISA-GM1 con anticuerpos poli y monoclonales para la búsqueda de toxinas termolábil (LT) y/o termoestable (ST).
- inmunodifusión, hemaglutinación pasiva, y otras.

Identificación de ECEH

En los casos en que la muestra de MF se presente con muy escasos o sin leucocitos y con abundante sangre, o bien el paciente presente clínica sospechosa de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), la misma deberá ser sembrada para la búsqueda de ECEH.

En este sentido, el Servicio de Fisopatogenia del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" recomienda recolectar la MF lo antes posible después del inicio de la diarrea, ya que la excreción de ECEH se produce en los primeros 7 días.

El paciente no debe estar con tratamiento antibiótico. En caso contrario, se deberá recolectar la MF después de suspender el antimicrobiano por no menos de 48 hs.

La MF recolectada deberá ser refrigerada y procesada dentro de las 2 horas de obtenida. De no ser posible, se la deberá colocar en un medio de transporte (Cary Blair, Stuart, Amies o solución bufferada con glicerol). En caso de que el procesamiento se efectuara dentro de los 2-3 días de obtenida la muestra, el medio de transporte debe ser refrigerado, en caso contrario congelar a -70ºC.

El agar Mac Conkey Sorbitol es el más utilizado para detectar *E.coli* O157: H7 y O157: HNM (H no móvil) dada la incapacidad de estos microorganismos para fermentar el sorbitol luego de una incubación a 35 ºC durante 18 – 24 hs.

Sin embargo la sensibilidad del medio se ve disminuida en función del inóculo del patógeno a estudiar y la gran cantidad de microorganismos habituales del contenido fecal. Para superar el inconveniente, se recomienda el cultivo previo en medios de enriquecimiento suplementados con cefixima y el telurito de potasio, que actúan como inhibidores de la flora fecal acompañante.

Otros medios de cultivo, basados en sus propiedades bioquímicas, identifican a *E. coli* O157: H7 dándole a la colonia un color característico que permite reconocerla fácilmente.

Una vez caracterizadas bioquímicamente como *E. coli* se las debe sero-agrupar. La serotipificación es un procedimiento que en la práctica se efectúa o confirma en los laboratorios de referencia y consiste en la detección del antígeno flagelar, previa estimulación de la movilidad en medios específicos (medio Craige).

El seroagrupamiento consiste en detectar la presencia del antígeno O157 mediante una reacción Ag – Ac utilizando antisueros policlonales

anti O157. Existen en el mercado reactivos de aglutinación en placa, en general constituidos por partículas de látex recubiertas de anticuerpos anti – O157 y otros.

Se deberá comprobar la producción de la toxina por estas cepas, utilizando ensayos inmuno - enzimáticos (ELISA) o métodos inmunocromatográficos

Para la caracterización, también podrá utilizarse la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés) utilizada para la búsqueda de genes que codifican para la producción de toxina. Esta técnica, es sensible, específica y rápida para detectar cepas de ECEH O157 y no O157 y permite el diagnóstico temprano de las diarreas asociadas a este microorganismo.

Dado que en cepas de *E. coli* O157 existe una estrecha correlación entre la producción de toxina (Stx) y de enterohemolisina (Hly), se considera que la detección de esta última puede ser un marcador epidemiológico útil para seleccionar rápidamente probables cepas de ECEH.

En esta técnica, se emplean placas con agar sangre suplementada con 10 mg de Cl_2Ca preparadas con glóbulos rojos de oveja defibrinados y lavados. Como control se emplean placas de agar sangre de oveja sin lavar y sin el agregado de Cl_2Ca.

A partir de cultivos jóvenes se siembran en paralelo ambas placas.

Luego de 3 hs. de incubación se realiza una primera lectura para la detección de α-hemolisina (α-Hly) y se vuelve a incubar hasta 20-22 hs. para la segunda lectura de hemólisis típica (zona muy fina alrededor de la colonia).

En cada placa se pueden ensayar varias cepas y el único requisito es emplear sangre fresca de no más de 10 días.

La concordancia entre la producción de Stx y de E–Hly supera el 90%.

Ya ha sido demostrado que las técnicas de separación inmunomagnética permiten la detección de *E. coli* O157 elevando la sensibilidad a niveles tales como detectar 100 UFC por gr. de materia fecal en presencia de 10^7 UFC bacterias coliformes acompañantes, separando así los microorganismos de interés.

Si bien estas últimas técnicas están diseñadas en Argentina, para ser usadas en alimentos, podrían adaptarse a muestras fecales en caso necesario.

Se han desarrollado métodos rápidos de enzimoinmunoensayo de tamizaje de *E. coli* O157 y otros serotipos de ECEH en alimentos, basados

en la incorporación de anticuerpos contra el antígeno somático O157, el flagelar H7, y las toxinas.

También existen métodos inmunológicos de tipo cromatográficos donde los anticuerpos marcados reaccionan con los antígenos O157 dentro de una muestra preenriquecida y que ha sido corrida sobre un soporte poroso (por ej. de silicagel). Estos test inmunocromatográficos están disponibles en la Argentina para la pesquisa rápida de antígenos O157 y la detección de vero toxinas.

Conociendo las características microbiológicas de ECEH, la probabilidad de recuperación de la bacteria en materia fecal, y la necesidad de brindar un diagnóstico rápido, es posible diseñar un algoritmo de diagnóstico según las posibilidades de cada laboratorio.

Detección de la toxina libre en MF
Ensayo de citotoxicidad específica en células Vero:

Esta técnica es utilizada para la detección de la toxina libre en MF. Permite detectar Stx1, Stx2 y sus variantes en extractos filtrados de materia fecal o de cultivos bacterianos. La neutralización mediante la utilización de antisueros policlonales o monoclonales le confiere especificidad y es considerada por su sensibilidad como la "goldstandard". Generalmente, su uso está restringido a los laboratorios de referencia, debido a los altos costos y laboriosidad que demanda.

Ensayos inmunoenzimáticos: existen equipos comerciales que permiten detectar Stx1, Stx2 juntas o separadas.

Métodos serológicos: Detección de anticuerpos marcadores
Procedimiento

Se deben tomar 2 muestras de suero del paciente: una al inicio de la enfermedad y la segunda a los 15 – 20 días.

El ensayo se realiza en células Vero utilizando toxinas de cepas de referencia.

Se considera seroconversión un aumento en el título de anticuerpos mayor o igual a 4 entre la 1º y la 2º muestra.

También podrían adaptarse técnicas inmunoenzimaticas o inmunocromatográficas.

Identificación de ECEI

El mecanismo de invasión propio de ECEI se evidencia en la observación microscópica. Presenta una repuesta inflamatoria similar a la producida por *Shigella* spp.

La MF se debe sembrar en un medio de enriquecimiento: Caldo Selenito, utilizando un inóculo denso. Incubar a 35ºC 18hs.

Una vez cumplida la mencionada incubación se transfieren tres ansadas del Caldo Selenito a un Agar Salmonella-Shigella (SS) u otro medio lactosado como Agar Xilosa-Lactosa-desoxicolato (XLD), MacConkey, EMB etc. Incubar 24 hs a 35ºC.

Seleccionar del EMB las colonias no fermentadoras de lactosa, si las hubiere y del SS las colonias no fermentadoras de lactosa.

Si la serología con sueros polivalentes para *Shigella* es negativa, confirmar con pruebas bioquímicas probable cepa ECEI**.**

Para ECEI, confirmar con el test de queratoconjuntivitis en ojo de cobayo (Test de Séreny) y ELISA.

> Identificación de *Samonella* spp., y *Shigella* spp.

Para la identificación, se debe sembrar la MF en un medio de enriquecimiento, que puede ser Caldo Selenito utilizando además, un inóculo denso. Posteriormente, la muestra se deberá incubar a 35ºC durante no más de 18 hs.

Luego de cumplida la incubación se transfieren tres ansadas del Caldo Selenito a una placa de agar Salmonella-Shigella (SS) u otro medio lactosado (Agar Xilosa-Lactosa-desoxicolato (XLD), MacConkey, EMB u otro) y se procede a incubarla nuevamente a 24 hs a 35ºC.

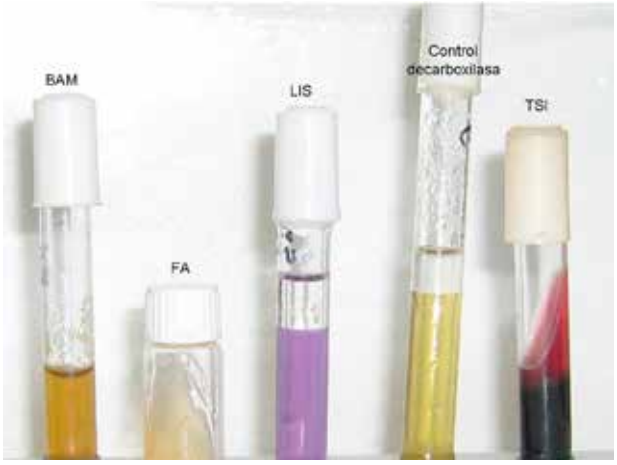
Finalmente, del medio SS se seleccionarán las colonias no fermentadoras de lactosa con y sin punto negro (productoras de SH_2). En caso de haber utilizado el medio EMB, se seleccionarán las colonias no fermentadoras de lactosa, si las hubiere.

Resultados de las pruebas bioquímicas típicas
de *Salmonella* spp. en materia fecal

- BAM: movilidad (+) urea (-) lactosa (-).
- TSI: Alcalino/Acido Gas (-/+) SH_2 (+)
- IMVIC: (-) (+) (-) (v)
- FA: fenilalanina
- LIS (+)

(BAM: Buenos Aires Medio, TSI: agar hierro triple azúcar, IMVIC: Indol,Rojo de Metilo, Voges-Proskauer y Citrato, FA: Fenilalanina, LIS: Lisina,)

Serología con antisueros de *Salmonella*: (+)



Pruebas bioquímicas típicas de *Salmonella* spp. (BAM: Buenos Aires Medio, FA: Fenilalanina, LIS: Lisina, TSI: agar hierro triple azúcar).

Resultados de las pruebas bioquímicas típicas de *Shigella* spp. en materia fecal

- BAM: movilidad (-) urea (-) lactosa (-).
- TSI: Alcalino/Acido Gas (-) SH2 (-)
- IMVIC: (v) (+) (-) (-)
- LIS (-)
- Acetato 48 hs (-)
- Urea (-)

Serología con antisueros de *Shigella*: (+)

Pruebas bioquímicas típicas de *Shigella* spp. (TSI: agar hierro triple azúcar, BAM: Buenos Aires Medio, LIS: Lisina).

Interpretación

1. Pruebas bioquímicas compatibles con *Shigella* spp., incluyendo acetato (-), con serología (-): Informar: *Shigella* spp.
2. Pruebas bioquímicas compatibles con *Shigella* spp., incluyendo acetato (-), con serología (+): Informar: *Shigella disenteriae; S. sonnei; S. flexneri; S. boydii* según corresponda.

3. Serología cruzada, y pruebas bioquímicas compatibles con *Shigella* spp.; incluyendo acetato (-): Informar*: Shigella* spp.
4. Pruebas bioquímicas compatibles con *Shigella* spp., incluyendo acetato (+), indol (+), con serologia (-): Informar: *Escherichia coli* lactosa (-).
5. Pruebas bioquímicas compatibles con *Shigella* spp.*,* acetato (+) y serología (+): Informar: *Escherichia coli* lactosa (-).

Seleccionar los BAM sin cambio (cepas no fermentadoras de lactosa y no productoras de ureasa), móviles (ver esquema para *Salmonella* spp.) o inmóviles (ver esquema para *Shigella* spp.) y transferir a un agar Hierro Triple Azúcar (TSI). Incubar 24 hs a 35ºC.

A los TSI con fondo ácido, pico alcalino y sin gas ni SH_2 provenientes de BAM sin cambio movilidad negativa; realizar serología para *Shigella* con sueros polivalentes.

A los TSI con fondo ácido, pico alcalino y producción de SH_2 con o sin gas provenientes de BAM sin cambio movilidad positiva; realizar serología para *Salmonella* con sueros polivalentes. De ser negativa, confirmar con pruebas bioquímicas de que no se trate de una cepa perteneciente a la Familia *Proteae*.

> Identificación de *Aeromonas* spp.

Para la identificación de esta bacteria, se debe sembrar la MF en una placa de agar sangre (AS) e incubarla por 18 hs a 35ºC.

Aeromonas spp. en placa de agar sangre.

Posteriormente, se seleccionarán 5 a 6 colonias β-hemolíticas y 5 a 6 colonias no hemolíticas, para ser transferidas a estrías de agar nutritivo (AN). En ese medio, se las volverá a incubar por un período de 24 hs a 35ºC.

Una vez finalizada la incubación, de las estrías de AN se procede a realizar la determinación de las cepas productoras de oxidasa mediante la utilización de discos o con papel de filtro embebido en una solución acuosa al 1% de oxalato de p-aminodimetilanilina. Una vez determinadas, se las transfiere a TSI y BAM.

Se seleccionan las cepas cuyos BAM sean sin cambio y móviles y los TSI ácido/ácido o alcalino/ácido, con o sin gas, SH_2 negativo. A estas cepas se les realizarán las pruebas bioquímicas mínimas, como producción de indol y de desoxirribonucleasa (DNAsa), para una identificación presuntiva.

Es importante recordar que, dada la similitud en sus características fenotípicas, el género *Aeromonas* debe ser diferenciado de los géneros *Vibrio*, *Plesiomonas* y *Chromobacterium*.

En caso de sospecha de la presencia de *Vibrio cholerae*, se debe realizar serología para *Vibrio* con antisueros polivalentes y comunicar inmediatamente a las autoridades correspondientes, enviando la cepa sospechosa al Laboratorio de Referencia.

> Identificación de *Campylobacter* spp.

Para identificar este micoorganismo, se debe sembrar la MF directamente en medio de enriquecimiento CHAN, utilizando un inóculo denso. Luego, se deberá incubar la muestra de 24 a 48 hs, a 42ºC, en atmósfera de 10% de H_2, 10% de CO_2 y 80% de N_2, mediante el método de evacuación-reemplazo. Opcionalmente, podrá utilizarse como atmósfera un recipiente con vela con medios suplementados con FBP; Sistema Gas-Pack sin catalizador de paladio.

Subcultivar el medio CHAN en agar Skirrow modificado, manteniendo el sistema de incubación ya descripto (temperatura y atmósfera) y por un período de tiempo similar.

Finalizada la incubación, se procede a seleccionar las colonias características en medio Skirrow y se realiza pruebas de identificación presuntivas

- Examen en fresco entre porta y cubre para ver la movilidad característica.
- Utilizar agua estéril para realizar la suspensión ya que la solución fisiológica inhibe la movilidad.
- Coloración de Carbol fucsina a fin de observar la morfología característica.
- Producción de la Catalasa.
- Oxidasa.

Posteriormente se las somete a las siguientes pruebas confirmatorias:

- Crecimiento a 42-43°C y a 25°C.
- Sensibilidad al ácido nalidíxico y cefalotina.
- Hidrólisis del hipurato.
- Producción de ácido sulfhídrico.
- Crecimiento en Glicina al 1%.

Características Bioquímicas de Especies de *Campylobacter* con importancia en diarreas agudas

	Campylobacter jejuni		*Campylobacter coli*
	jejuni	*doyle*	
Producción Catalasa	Positivo	Positivo	Positivo
Oxidasa	Positivo	Positivo	Positivo
Crecimiento a 42-43°C	Positivo	Positivo	Positivo
Susceptibilidad al ácido nalidíxico	Sensible	Sensible	Sensible
Susceptibilidad a la cefalotina	Resistente	Variable	Resistente
Hidrólisis del hipurato	Positivo	Positivo	Negativo
Producción de ácido sulfhídrico	Negativo	Negativo	Negativo/débil
Crecimiento en Glicina al 1%	Positivo	Positivo	Positivo

Fuente: adaptada del Manual de Procedimiento del Ministerio de Salud ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas.

Búsqueda de *Vibrio cholerae*

Toma de muestra

La mejor muestra es la materia fecal recién evacuada, la cual será tomada por un hisopado rectal o en caso de diarrea acuosa, directamente de la evacuación espontánea en frasco estéril, ya que su alcalinidad permite mantener viable a *V. cholerae*.

Es importante señalar que las muestras no deben tomarse del recipiente donde el enfermo realizó la deposición ya que puede haber contaminación con defecaciones anteriores, en cuyo caso pueden obtenerse resultados falsos positivos o, por el contrario, si el recipiente ha sido desinfectado y no se ha eliminado convenientemente el principio activo del desinfectante utilizado, el análisis bacteriológico podría dar resultados falsos negativos.

Transporte de la muestra

El medio de transporte de elección es el Cary Blair. Si no se dispone de este medio, se puede utilizar agua peptonada alcalina (APA) pH 8,6, teniendo en cuenta de que es un caldo de enriquecimiento y no deben pasar más de 8 horas para procesar la MF en el laboratorio. Si transcurriera un tiempo

mayor al indicado, se deberán transferir 2 o 3 ansadas de este cultivo a un nuevo tubo con APA.

Las muestras deben transportarse a temperatura ambiente. Si la temperatura ambiente es muy elevada, pueden utilizarse refrigerantes, pero sin llegar jamás a congelarlas.

Técnica de aislamiento

El APA facilita el aislamiento de vibriones de personas convalecientes y de portadores, pero no es necesario para los casos agudos.

El APA se debe inocular con dos o tres ansadas de una suspensión de materia fecal o hisopado rectal y se lo debe incubar por espacio de 6 a 8 horas a 35 °C, pero no superar ese tiempo, dado que *Vibrio cholerae* prolifera rápidamente en este medio y estará presente en cantidades mayores que los organismos que no pertenecen a esta especie.

Luego, tomando de la película superficial con un ansa, sembrar placas en agar tripticasa soya (ATS) o agar sangre (AS) y agar TCBS (tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa).

Después de 8 horas puede ocurrir que el número de otros organismos sea superior al de *Vibrio cholerae* y en estos casos conviene transferir 2 o 3 ansadas de este cultivo a un nuevo tubo con APA, como lo señalamos anteriormente.

Es importante recordar que la prueba de oxidasa como la serología deben realizarse a partir de colonias provenientes del ATS o del AS, y no directamente del TCBS dado que es posible obtener falsos negativos debido a la formación de productos de la fermentación ácida de la sacarosa. Además, las colonias de *V. cholerae* en dicho medio generalmente son pegajosas, lo que dificulta la aglutinación directa.

Realizar esta prueba tanto a las colonias sospechosas, de color amarillo, como a las que son azul-verdosas, si las hubiera, ya que podrían pertenecer a una especie diferente (no *cholerae*).

Finalmente, cabe destacar que no solo *V. cholerae* puede presentarse en colonias amarillas en TCBS, ya que también *V. alginolyticus*, *V. cincinnatiensis, V. fluvialis, V. furnissi, V. metschnikovii* y algunos biotipos de *V. vulnificus* pueden presentar esta característica colonial, debido a que todos ellos fermentan sacarosa.

Pruebas bioquímicas complementarias

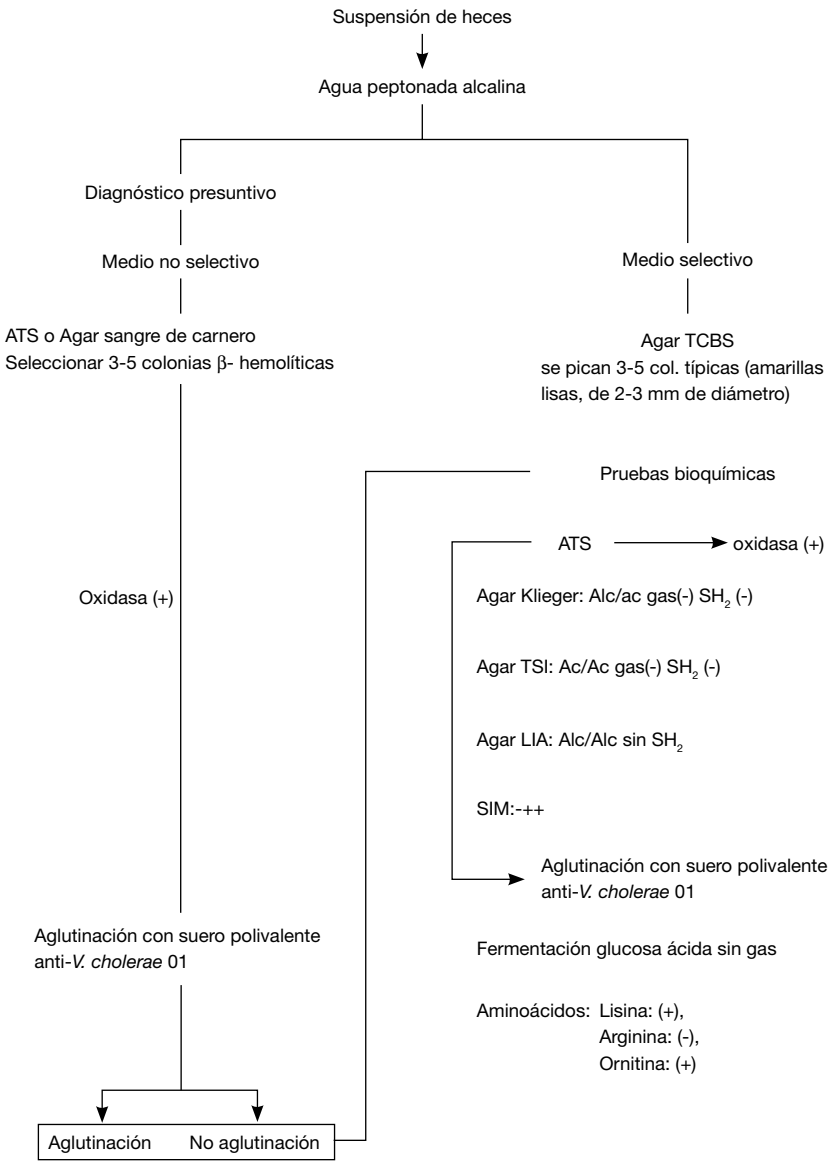
Luego de la realización de las pruebas mínimas referidas en el esquema de siembra, realizar pruebas complementarias para diferenciar *Vibrio cholerae* de otros organismos relacionados.

Pruebas especiales

Diferenciación de *Vibrio cholerae* O1 en biotipos clásicos o El Tor.

Pruebas	Biotipo	
	Clásico	El Tor
Hemaglutinación de eritrocitos de pollo u oveja	-	+
Hemólisis de eritrocitos de oveja	-	+ [1]
Resistencia a la polimixina B	S	R
Voges-Proskauer	(2)	+

[1] No todos los biotipos El Tor son positivos. [2] Las reacciones de Voges-Proskauer no son siempre típicas.



Esquema 5. Esquema de siembra de *Vibrio cholerae.*

Envío y transporte de cepas para su confirmación:

Toda cepa sospechosa de ser ECEI, *Shigella, Salmonella*, *Campylobacter, Vibrio* y/o *Aeromonas* deberá ser enviada a un Laboratorio de Referencia, para su confirmación bioquímica, serológica y estudio de la producción de enterotoxina.

Las cepas se enviarán en agar nutritivo o ATS en estría o por punción en agar blando (caldo nutritivo con 0,75% de agar) en tubos a rosca o tubos de hemólisis con tapón de goma en cajas convenientemente acondicionadas, siguiendo las normas de envío de material biológico.

No enviar las cepas en TSI, ni en ningún medio que contenga carbohidratos o inhibidores.

Para el estudio de toxina colérica, es importante que el cultivo enviado tenga el menor número de pasajes posibles para evitar la pérdida de la toxicidad.

Bibliografía consultada

Aydın Tutak G, Tuğrul HM. Investigation of pathogenic Escherichia coli strains in patients with diarrhea. *Mikrobiyol Bul*. 49(1): 124-9. 2015.

Argentina Vigilancia integrada de síndrome urémico hemolítico. 27 de enero de 2015 – Boletín Integrado de Vigilancia – Secretaría de Promoción y Programas Sanitarios – Ministerio de Salud de la Nación (Argentina) Introducción El síndrome urémico hemolítico (SUH)

Ateba CN, Bezuidenhout CC. Characterisation of *Escherichia coli* O157 strains from humans, cattle and pigs in the North-West Province, South Africa. Int J Food Microbiol. 2008; 128(2): 181-8.

Avery LM, Williams AP, Killham K, Jones DL. Survival of *Escherichia coli* O157: H7 in waters from lakes, rivers, puddles and animal-drinking troughs. *Sci Total Environ*. 2008; 389(2-3): 378-85.

Binsztein N, De Petris A, Eiguer T, Maurel D, Nader O, Notario R, Novillo A, Picandet AM, Rivas M, Szefner M, Vergara M. Proyecto Colaborativo Multicéntrico. Secretaría de Ciencia y Técnica de la Nación (SECyT). (Nómina completa de autores en SECyT). Enteropatógenos asociados a diarrea aguda infantil en Argentina. Medicine. 47: 656. 1987.

Binsztein N, Picandet A M, Notario R, Patrito E, De Lesa M E, De Petris A, Maurel D, Nader O, Rivas M, Szefner M, Vergara M. : Proyecto Colaborativo Multicéntrico. Secretaría de Ciencia y Técnica de la Nación (SECyT). (Nómina completa de autores en SECyT). Resistencia a los antimicrobianos de especies de *Salmonella, Shigella*, *Escherichia* y *Aeromonas* aisladas de niños diarreicos en siete centros de Argentina. En: *Rev Lat-amer Microbiol* 41: 121-126. 1999.

Boletín laboratorio y vigilancia al día. Instituto de Salud Pública de Chile-Vigilancia de E coli diarrogénica DEPARTAMENTO DE ASUNTOS CIENTÍFICOS N° 12 / 24 de Mayo 2012.

Boletín Integrado de Vigilancia | N° 129- SE 29 - 2012 | Página 20 de 73 REPÚBLICA ARGENTINA

OMS: "Campylobacter". Nota descriptiva 255. OCT 2011.

Cómo combatir el Cólera. Center for Disease Control and Prevention. Diciembre, 2010.

En: http://www.cdc.gov/cholera/pdf/clinicalmanagement_sp.pdf

Da Silva Quetz J, Lima I F, Havt A, de Carvalho E B, Lima N L, Soares A M, Mota R M, Guerrant R L, Lima A A. Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in children from communities in Northeastern Brazil: molecular detection and relation to nutritional status. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 67(3): 220-7. 2010.

Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología. *Diarrea aguda en adultos y niños: una perspectiva mundial.* Febrero de 2012.

Ifeanyi CI, Ikeneche NF, Bassey BE, Al-Gallas N, Ben Aissa R, Boudabous A. Diarrheagenic Escherichia coli pathotypes isolated from children with diarrhea in the Federal Capital Territory Abuja, Nigeria. *J Infect Dev Ctries*. 9(2): 165-74. 2015.

Lima I F, Boisen N, Quetz Jda S, Havt A, de Carvalho E B, Soares A M, Lima N L, Mota R M, Nataro J P,Guerrant R L,Lima A A. Prevalence of enteroaggregative Escherichia coli and its virulence-related genesin acase-control study among children from north-eastern Brazil. *J Med Microbiol*. (62) 683: 93. 2013.

Lindsay B R, Chakraborty S, Harro C, Li S, Nataro J P, Sommerfelt H, Sack D A, Colin Stine O. Quantitative PCR and culture evaluation for enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) associated diarrhea in volunteers. *FEMS Microbiol* (1): 25-31. 2014.

Naylor SW, Nart P, Sales J, Flockhart A, Gally DL, Low JC. Impact of the direct application of therapeutic agents to the terminal recta of experimentally colonized calves on *Escherichia coli* O157: H7 shedding. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73(5): 1493-500.

Porter RS, Kaplan JL, Homeier BP, Beers MH, editors. The Merck manual of diagnosis and therapy [online]. 18th ed. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co. ; 2005. *Escherichia coli* infections. Available at: http://www.merck.com/mmpe/sec14/ch173/ch173f.html#sec14-ch173-ch173f-720.Accessed 3. Mar 2009.

Patzi-Vargas S, Zaidi MB, Perez-Martinez I, León-Cen M, Michel-Ayala A, Chaussabel D, Estrada-Garcia T. Diarrheagenic *Escherichia coli* Carrying Supplementary Virulence Genes Are an Important Cause of Moderate to Severe Diarrhoeal Disease in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*. 4; 9(3): 1-18. 2015.

Public Health Agency of Canada. Material Safety Data Sheet – *Escherichia coli*, enterohemorrhagic. Office of Laboratory Security; 2001 Jan. Available at: http://www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/msds63e-eng.php. Accessed 2 Mar 2009.

Rivas M, Sosa-Estani S, Rangel J, Caletti M G, Vallés P, Roldán C D, Balbi L, Marsano de Molla M Cr, Amoedo D, Miliwebsky E, Chinen I, Hoekstra R M, Mead P, Griffin P M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children, Argentina. EID 14(5): 763-771. 2008.

Vergara M, Quiroga M, Deschutter J, Grenón S, Pegels E, González C, Britto L, Jordá G, Villalba V, Centeno J, López O, Chade M. Identificación de enteropatógenos en la diarrea de la infancia en un estudio realizado en la ciudad de Posadas, Misiones. *Medicina Misiones II*. (1): 3. 1988.

Vergara M, Quiroga M, Grenón S, Pegels E, Oviedo P, Deschutter J, Rivas M, Binsztein N, Claramount R. Prospective study of enteropathogens in two communities of Misiones, Argentina. Rev Inst Med Trop S Paulo 38 (5): 337-347. 1996.

Vergara M, Quiroga M, Grenón S, Pegels E. Enteropatógenos en la diarrea infantil de la ciudad de Posadas, Misiones. *Infect Microbiol Clin* 5: 106-112. 1993.

Vergara M, Quiroga M, Grenón S, Villalba V, Pegels E, Chade M, González C, Binsztein N, Eiguer T, Depetris A. Identificación de enteropatógenos en la diarrea de la infancia en un estudio realizado

en la ciudad de Posadas, Misiones, República Argentina. *Rev Latamer. Microbiol.* 34: 71-75. 1992.

Vergara M, Quiroga M, Grenón S, Villalba V, Pegels E, Husulak E. Hallazgos bacteriológicos en infecciones pediátricas en Posadas, Misiones en el año 1988. *Medicina Misiones IV* (1): 9. 1990.

Vergara M, Villalba V, Amer L, Centeno J, López O, Eiguer T, Caffer MI. Primeros aislamientos de *Salmonella zaiman* en humanos. *Rev Argent Microbiol* 21(2): 89-91. 1989.

Vergara M. Capítulo 145. Diarrea Aguda: Mecanismos de Patogenicidad. Microbiología Biomédica. Editores Basualdo JA, Coto C, de Torres R. Editorial Atlante S. R. L. 1996. Pp. 1157-1163.

Vergara M, Deschutter J, Villalba V, Grenón S, Quiroga M, Pegels E, González C. Primer aislamiento de *Campylobacter jejuni* en Misiones. Importancia de su estudio en pacientes con gastroenteritis severa. *Medicina Misiones III* (1): 19. 1989.

Vergara M, Eiguer T, Grenón S, Quiroga M, Caffer M. I, Pegels E, Villalba V. *Salmonella hadar*: primeros casos humanos en la República Argentina. *Infect Microbiol Clin* 1(3): 45-46. 1989.

Vergara M, Maestres Mesa J, Suarez Moreno O, Monté Taboada R. *Vibrio cholerae* toxigénico: identificación del gen *ctx B*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 15: 181-185. 1997.

Vergara M, Quiroga M, Oviedo P, Pegels E.: "Enfermedad Diarreica Aguda (EDA)". *Las Infecciones Bacterianas y el Laboratorio de Bacteriología*. 1º ed. Posadas: EdUNaM. 2009. Pp. 373-445.

Vergara Marta, Quiroga Marin y otros: *Estudios sobre la diarrea de la infancia en la ciudad de Posadas, Misiones, Argentina*. 1a ed. Posadas: EdUNaM. Colección Libros Digitales. 2011.

Viboud GI, Jouve MJ, Binsztein N, Vergara M, Rivas M, Quiroga M, Svennerholm AM. Prospective cohort study of enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in Argentinian children. J Clin Microbiol 37 (9): 2829-2833. 1999.

V. *cholerae* O139: *Rev. argent. microbiol*. vol. 43 no. 2 Ciudad Autónoma de Buenos Aires, jun. 2011.

INFECCIÓN POR E coli ENTEROHEMORRÁGICA (EHEC) PRODUCTORA DE TOXINA shiga, cepa O104:H4. En: http://www.sati.org.ar/files/infectologia/E-coli-Enterohemorragica-EHEC-Recomendaciones-CIC.pdf..

CAPÍTULO 8
Las infecciones bacterianas perinatológicas

Las bacterias y la virulencia ■ marta vergara
tratamiento antimicrobiano: mabel rinaldi

Las infecciones que se adquieren durante la gestación, muchas veces inaparentes y asintomáticas, pueden, en el feto o en el recién nacido, producir una severa enfermedad y hasta abortos y mortalidad neonatal.

Es de esperar que se pueda caracterizar las poblaciones de riesgo, las infecciones más prevalentes y sus métodos diagnósticos precisos, rápidos, sensibles, adecuados y oportunos a fin de lograr una vigilancia epidemiológica adecuada, disminuyendo estas infecciones**.**

Camino al Daño

Las bacterias

Streptococcus agalactiae, ß- hemolítico grupo B (SGB)

Streptococcus beta hemolítico del grupo B de Lancefield*, Streptococcus agalactiae* grupo B (SGB) constituye parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal y urogenital. *Este* microorganismo ha demostrado ser también un agente etiológico importante en un amplio espectro de infecciones en adultos susceptibles (diabéticos, alcohólicos, etc).

Es causa importante de infecciones durante el embarazo y el puerperio, causando corioamnionitis, endometritis postparto, infección urinaria, infección de herida quirúrgica post-cesárea, sepsis puerperal y actualmen-

te se incrementa su asociación con severas infecciones invasivas en adultos y representa una común causa de meningitis, sepsis y neumonía neonatal.

SGB está también asociado a infección urinaria, infección de herida quirúrgica post-cesárea, sepsis puerperal y actualmente se incrementa su asociación con severas infecciones invasivas en adultos en general y en la embarazada, como neumonía, peritonitis, endocarditis, meningitis, osteomielitis, artritis, celulitis necrotizante, fascitis necrotizante, entre otras.

Se trata de un microorganismo que forma parte del contenido microbiano normal del tracto genital e intestinal humano y se recupera entre el 15 a 20 % en el sexo femenino.

Es desde este sitio de reservorio desde donde coloniza la vagina y con frecuencia el tracto urinario.

Debido a su asociación con infecciones perinatales, la colonización del tracto genital femenino por SGB ha adquirido mayor relevancia.

La corioamnionitis, RPM (rotura prematura de membranas), PPT (parto pretérmino) y endometritis postparto son severas complicaciones producidas por esta bacteria. Si bien estas patologías tienen una causalidad multifactorial, la infección por estos microorganismos tiene un peso importante.

Entre 5 a 30% de las mujeres en edad fértil portan a SGB en forma asintomática en su tracto genital y rectal.

La tasa de transmisión vertical es mayor al 50%.

> **La prevalencia de la portación en gestantes muestra gran variabilidad geográfica y aumenta con la paridad, la infección de la herida quirúrgica y la sepsis puerperal.**

La prevalencia de la portación está vinculada a la actividad sexual, como parejas múltiples e inicio temprano de relaciones sexuales.

La recuperación de SGB de muestras clínicas naturalmente contaminadas, se favorece con el agregado de antimicrobianos que, como colistin y nalidíxico o gentamicina entre otros, posibilita aislamientos más ricos y puros, al ser inhibida la microbiota acompañante.

SGB es uno de los principales agentes causales de sepsis, meningitis y neumonía en el recién nacido como presentación de enfermedad invasiva (enfermedad neonatal precoz), además de la presentación tardía de sepsis-meningitis.

Hace ya 30 años que SGB ha emergido como agente causante de infecciones perinatales.

La severidad de la enfermedad en el neonato se traduce en un importante factor de morbimortalidad neonatal además de incrementar los costos en la salud tanto pública como privada.

Entre un 50 a 75% de los recién nacidos de madres portadoras de SGB se colonizan en el momento del parto, siendo entre 1a 2% el porcentaje de recién nacidos que desarrollará una infección invasiva temprana.

Entre 10 a 30% de las mujeres en edad fértil portan SGB en forma asintomática en su tracto genital y rectal.

Es de este sitio de reservorio desde donde coloniza la vagina y con frecuencia el tracto urinario, situación especial en gestantes.

La colonización de las mucosas de los neonatos se produce por la transmisión vertical desde la madre, ya sea en el útero por vía ascendente o en el momento del parto.

Por ello, como resultado de la aspiración de líquido amniótico infectado en el útero, posterior a la rotura de membrana, o de secreciones durante el parto, los neonatos pueden desarrollar neumonía que progresa a la infección sistémica. También la adquisición de SGB puede ocurrir intraútero con membranas intactas.

La colonización del tracto genital que puede ser intermitente, se transforma en un riesgo para las gestantes, por la posibilidad de trasmitir la bacteria al recién nacido, representando una fuente significativa de morbimortalidad perinatal y adquiriendo por ello mayor relevancia.

La tasa de trasmisión vertical es alrededor del 50%, lo que aumenta significativamente el riesgo de infección de inicio precoz del neonato si es una colonización materna intensa.

Esta variación depende de la población estudiada, su lugar geográfico de residencia, la edad, la multiparidad, el inicio temprano de las relaciones sexuales y otros factores, entre ellos también involucrados los que atañen al laboratorio, como diversos medios de cultivos y métodos diagnósticos utilizados.

El 1 a 2% de estos recién nacidos hijos de madres colonizadas al momento de la parición, desarrollan una infección sintomática por SGB, donde aproximadamente el 90% de los casos ocurre durante las primeras 24 hs de vida (presentación precoz, siendo la incidencia de las infecciones en el recién nacido hasta de 3 por cada 1000 nacidos vivos).

Los factores de alto riesgo para la transmisión de infección neonatal por SGB son: amenaza de (PPT) (menos de 37 semanas), (RPM) (de más de 12 horas), fiebre intraparto (FIP) (mayor a 37,5 ºC).

La presencia de bacteriuria durante el embarazo causada por esta bacteria y el haber tenido hijos con SGB son también factores de riesgo.

SGB es causante de las infecciones más graves que puede presentar un paciente en sus primeras horas de vida, siendo la incidencia del 0,03% para sepsis temprana y 0,05 a 0,1% para sepsis tardía. Cuando existe RPM, FIP o PPT, este porcentaje aumenta abruptamente.

Entre los factores predisponentes para adquirir la infección se encuentran aquellos relacionados con un incremento de la susceptibilidad en el huésped por los bajos niveles de anticuerpos anticapsulares que genera el serotipo infectante.

En las gestantes esta situación es aún más preocupante ya que estos bajos niveles de anticuerpos o adecuados niveles pero con nacimiento pretérmino, agregado al reducido pasaje trasplacentario de inmunoglobulina G, contribuyen al riesgo.

La infección invasiva de inicio precoz, ocurre por una transmisión vertical y hace su aparición dentro de los 6 primeros días de vida, comenzando a las 12 hrs de nacer, generalmente, y se caracteriza por una clínica de presentación tórpida de distress respiratorio, apneas, neumonía, meningitis, sepsis y shock.

La infección de inicio tardío se presenta luego de la primera semana de vida y se manifiesta como una infección más localizada, con elevada incidencia de meningitis y bacteriemia, pero de mortalidad menor que la infección temprana.

SGB se presenta como un coco grampositivo dispuesto en cadenas.

Es un microorganismo facultativo y crece fácilmente en una amplia variedad de medios de cultivo.

Si bien desarrolla en medios no exigentes, el agregado de sangre o suero favorece su crecimiento.

Es un microorganismo catalasa y oxidasa negativa. En general las colonias miden 3 a 4 mm de diámetro y son de color blanco grisáceo, en medios con sangre ovina.

En la mayoría de los cultivos la bacteria presenta hemólisis β aunque existen cepas no hemolíticas.

La identificación de grupo B en *Streptococcus agalactiae*, se realiza por la detección del antígeno de pared celular específico y común a todas las cepas.

> El camino al Daño

En la patogénesis de SGB intervienen diversos factores de virulencia necesarios para la adherencia- para la invasión- para la injuria de barreras celulares y para escapar a las defensas del huésped.

La adherencia a las superficies epiteliales se logra mediante adhesinas proteicas bien definidas como las fimbrias, proteínas no definidas y estructuras no proteicas que tienen avidez por las células de la mucosa faríngea fetales, los alveolos y las membranas placentarias, además de unirse eficientemente a las células vaginales humanas al pH ácido habitual.

Esta adherencia es además fundamental tanto en la colonización del recto y del tracto genital en las mujeres embarazadas y en adultos no gestantes.

Otra estrucutura bien definida de la pared celular, el ácido lipoteicocico, posibilita la unión a proteínas como la fibronectina, fibrinógeno y laminina y a las células faríngeas fetales con mayor eficiencia que a esas células en adultos.

La cápsula de SGB juega un importante papel en la enfermedad al inhibir la fagocitosis por parte de macrófagos y neutrófilos, bloqueando los mecanismos inmunológicos y colaborando en la invasión.

La severidad de la enfermedad neonatal está determinada en gran medida por una serie de factores de virulencia codificados entre otros por el gen *cps* que codifica la cápsula y genes que codifican proteínas de superficie, necesarios todos para la interacción celular huésped- bacteria.

Además de ser un importante factor de virulencia en SGB, la cápsula tiene una estructura polisacárida que posibilita la distinción en serotipos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX), los que se presentan en combinación con diferentes proteínas de superficie (antigénicas), como α, β y Rib.

Una característica de las cepas de SGB es que la mayoría de los genes asociados a la virulencia, codifican proteínas necesarias para la interacción celular huésped bacteria y para la patogenicidad.

La primera proteína de superficie identificada en SGB fue el antígeno C el que está compuesto por las proteínas α y β.

SGB puede así expresar la proteína α –C o la proteína β-C o ambas a la vez.

La proteína α –C y la proteína β-C son codificadas por los genes *bca* y *bac*, respectivamente.

La α –C se asocia a la invasión de la célula epitelial y β-C a la inhibición de la fagocitosis al interaccionar con la fracción Fc de las IgA.

La proteína Rib, muy asociada a las cepas invasivas es codificada por el gen *rib*.

Otro factor de virulencia, la enzima de superficie, ScpB (C5a peptidasa) codificada por el gen *scp*B, está involucrada en el daño de neutrófilos y en la unión de la fibronectina para promover la adherencia y la invasión bacteriana de las células epiteliales.

Una proteína de superficie, la Lmb, que media en la adherencia a la laminina humana con daño epitelial, colaborando en la invasión del huésped es codificada por el gen *lmb*.

La proteína HylB codificada por el gen *hyl*B, colabora en la diseminación a través de los tejidos, con deterioro en el transporte de leucocitos.

El gen *cyl*E codifica una β-hemolisina que es una toxina asociada a la injuria de tejidos y diseminación sistémica contribuyendo a la meningitis.

Otras proteínas asociadas a la virulencia son las FbsA y FbsB.

La FbsA, codificada por el gen *fbs*A protege a la bacteria de la opsonofagocitosis y promueve su adherencia a las células epiteliales y del endotelio cerebral colaborando para que el patógeno atraviese la barrera hematoencefálica conduciendo a la meningitis.

La proteína FbsB, codificada por el gen *fbs*B, también se asocia a la invasión epitelial.

Otra proteína de superficie, la CspA, codificada por el gen *csp*A contribuye con la supervivencia en el huésped del SGB, logrando escapar a los mecanismos de la respuesta inmune.

Se han descripto variaciones geográficas, temporales, étnicas y según origen de las cepas, colonizantes o invasivas, en la distribución de los serotipos capsulares y de las proteinas de superficie y genes que las codifican en cepas de SGB.

Desde la observación de Lancefield en la década del 70, trabajando con modelos animales, referida a la protección que confiere el antígeno C contra las infecciones por SGB, se las implicó a estas proteínas de superficie, junto a la cápsula como generadoras de una respuesta inmune protectora.

Los antígenos de las proteínas de superficie y los genes que las codifican se consideran importantes para la caracterización epidemiológica de las cepas y su participación en estrategias vacunales.

Otro factor de virulencia, estructuras proteicas no definidas posibilitan la invasión celular de los epitelios y las barreras endoteliales, como paso fundamental en la patogénesis neonatal. Esta invasión celular tiene como consecuencia la producción de amnionitis, bacteriemia y diseminación sistémica, donde la sepsis adquirida intraútero es de curso precoz y generalmente fulminante.

Iniciado este proceso por endocitosis, la bacteria se aloja en una vacuola sentando cabecera de playa desde donde se inicia la infección sistémica. También la amnionitis puede ocurrir a través de membranas intactas por un proceso de trancitosis, atravesando el microorganismo las células del corion sin alteración de las zonas de unión de las mismas.

Otra consecuencia de esta invasión es la meningitis que ocurre por la llegada de SGB a las meninges, mediante la penetración de las bacterias en la barrera hematoencefálica, por trancitosis en monocapas de células endoteliales de vasos cerebrales.

Uno de los biotipos el III, es uno de los más implicados en este mecanismo, los que sobreviven intracelularmente y sin multiplicarse en los inicios de la invasión, escapando a la acción de antimicrobianos que actúan en la fase logarítmica de desarrollo, como las penicilinas, que son de elección.

Se asume que el ácido siálico asociado a la bacteria en especial en el biotipo III, al inhibir la activación de la vía alternativa del complemento, es un factor de virulencia más.

Por lo anteriormente revisado está establecida la relación entre la colonización del tracto genital de la embarazada en el momento del parto y la infección invasiva de inicio precoz en el neonato, la que además de producirse en las células epiteliales y endoteliales de las vías respiratorias ocurre en las células endoteliales de los pequeños vasos del encéfalo.

Nuestro grupo de trabajo ha realizado el primer aislamiento en la República Argentina del serotipo IX de SGB (Laczeski, y col (2014) publicado en: Molecular Profiles and Antimicrobial Susceptibility of First Isolates of *Streptococcus agalactiae* Serotype IX in Argentina. Advances in Microbiology, 4,474-483).

Otro factor de virulencia es la injuria directa de los tejidos mediante la producción de la β-hemolisina, que es una citolisina formadora de poros

con acción citotóxica directa, promoviendo la proliferación localizada de bacterias que dañan los tejidos y en especial el cerebral.

Se postula que esta hemolisina produce lesiones en pequeños vasos pulmonares aumentando su permeabilidad, la que conduce al edema alveolar y a la hemorragia típica de la neumonía por este microorganismo.

El peptidoglicano de la pared celular y la β-hemolisina inducen el sindrome séptico producido por la liberación de mediadores de la respuesta inflamatoria, las citoquinas IL-1 y FNT, principalmente, asociado a severa morbimortalidad.

La producción de proteasas y colagenasas que facilitan la destrucción del tejido placentario y de células epiteliales y endoteliales pulmonares y de una proteína que degrada el ácido hialurónico, la hialuronato liasa, que facilita la diseminación y que es producida en mayor concentración por SGB serotipos invasivos que colonizantes, constituyen importantes factores de virulencia.

Factores como los asociados a un elevado inóculo del microorganismo, situación frecuente por la colonización particularmente densa en la madre (agravada por manipulaciones obstétricas de monitoreo intrauterino o exámenes ginecológicos), posibilitan el ascenso de bacterias aumentando la exposición del feto, incrementando la vulnerabilidad a la enfermedad neonatal.

La severa morbimortalidad perinatal puede prevenirse con un diagnóstico simple buscando portación en la embarazada al término de su edad gestacional.

Desde el año 1996 el CDC (Center for Disease Control) elaboró guías para la detección y prevención de estas enfermedades y las reglamentó hacia el año 2002.

Las recomendaciones para prevenir la infección de neonatos por SGB se basaron fundamentalmente en realizar cultivos de exudado vaginal y rectal en embarazadas de 35-37 semanas de gestación y administrar profilaxis intraparto (PIP) a toda portadora de SGB como así también a las gestantes con factores de riesgo a las que no se les realizo el cultivo

En nuestro país, dicha reglamentación es ley nacional para todo el territorio nacional, desde abril del 2008: "la obligatoriedad de la realización de búsqueda de SGB en todas las embarazadas con edad gestacional entre las semanas 35 y 37, presente o no condiciones de riesgo".

En la provincia de Misiones, antes de la ley nacional mencionada anteriormente, se sancionó una ley sobre "la obligatoriedad de la realización del examen de detección de *Streptococcus* Grupo B a toda mujer em-

barazada en edad gestacional entre las semanas 35 y 37 y asimismo el tratamiento durante el parto y alumbramiento si el resultado de la detección resultare positivo".

- Prevención en la embarazada. Detectar factores de riesgo para portación de SGB.

Cuando una embarazada inicia su trabajo de parto se debe investigar la presencia de los siguientes factores de riesgo:

- Hijo previo afectado por infección neonatal por SGB
- Bacteriuria por SGB detectada durante el presente embarazo.
- Parto prematuro (menor a 37 semanas de gestación)
- Rotura prolongada de membranas igual o mayor a 18 hs.
- Fiebre igual o mayor a 38 ºC intraparto.

La presencia de uno solo de ellos obligará a indicar la PIP:

Profilaxis intraparto:

- Penicilina G sódica 5.000.000 UI, endovenosa. Repetir 2.500.000 UI, endovenosa, cada 4 horas hasta que se produzca el parto. Elección Prioritaria
- Opción de segunda línea- Ampicilina 2 g endovenosa. Luego 1 g endovenosa cada 4 hs. hasta que se produzca el parto.
- En Pacientes alérgicas a la Penicilina y derivados (x): Cefazolina/Cefalotina 2g endovenosa, luego 1g cada 8 hs hasta el parto, ó Clindamicina 900mg endovenosa cada 8 horas hasta el parto.
- En presencia de alergia mayor a la Penicilina y derivados (xx) Clindamicina igual esquema al anterior
- En presencia de resistencia del SGB a la Clindamicina: Vancomicina 1g endovenosa cada 12 horas hasta el parto.

*Interrogar cuidadosamente para evitar falsos diagnósticos (Las pruebas cutáneas no son útiles). Si ha habido síntomas que pueden caratularse como alergia menor, medicar con Cefalosporinas o Clindamicina.

**Alergia mayor a la Penicilina: antecedentes de anafilaxia (edema laríngeo, broncoobstrucción severa, hipotensión persistente), sindrome de Steven-Johnson o de Lyell, Eritema polimorfo extensivo. La frecuencia de presentación en la población es muy baja: 0,2 casos cada 10.000 tratamientos.

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes es un bacilo grampositivo, un enteropatógeno, agente causal de la listeriosis, que infecta a animales y humanos.

Está ampliamente distribuido en la naturaleza, en aguas, suelos, vegetales, alimentos y contenido intestinal de animales, mamíferos, peces, mariscos. Puede ser aislado de la tierra y de forrajes conservados en silos y otras fuentes medioambientales.

Las personas sanas, en general alrededor de un 1 a 5%, la portan en sus heces.

La infección humana está asociada a la ingestión de agua y alimentos contaminados durante su manipuleo o ingestión, como quesos, ensaladas, embutidos y carnes, en diferentes etapas de la cadena alimentaria, durante la producción en el campo, el procesamiento, la distribución y la preparación, o sea es la vía digestiva la principal fuente de infección.

En el hombre la infección puede presentarse esporádicamente o en epidemias y es fundamentalmente una infección oportunista que afecta principalmente a mujeres embarazadas, recién nacidos y adultos con deficiencias en el sistema inmune.

La alcalinización gástrica por antiácidos o cirugías de úlceras, puede favorecer la infección, la que es usualmente asintomática. La clínica de la listeriosis varía según el estado inmunológico del paciente.

Las enfermedades causadas por este microorganismo han llevado a ser reconocido como un importante problema de salud, ya que a pesar de ser las graves manifestaciones de la listeriosis (meningitis y/o encefalitis, septicemia, abortos u otras infecciones neonatales), de baja morbilidad, las tasas de mortalidad son importantes.

Recién en la década del 80 *Listeria monocytogenes* fue reconocida como un patógeno causal de la listeriosis, enfermedad muchas veces amenazante a la vida, fundamentalmente por las personas afectadas, ancianos, inmunodeprimidos, mujeres embarazadas y recién nacidos. La dosis infecciosa es baja 10^2UFC/cc, microorganismos, en grupos de riesgo, y más elevada en población sana.

La Listeria monocytogenes es un bacilo grampositivo, beta hemolítico corto, de alrededor de 0,4 a 0,5 por 0,5 a 2 μm, móvil, no esporulado ni ramificado, que se dispone en forma individual o formando cadenas cortas.

Con frecuencia se lo observa dispuesto como un difteroide típico en empalizada, lo que hizo que antiguamente se lo clasificara con las corinebacterias.

Es un microorganismo, aerobio o anaerobio facultativo capaz de sobrevivir en el interior de las células, incluso en células fagocíticas del sistema monocitomacrófago. Es un microorganismo catalasa positiva y oxidasa negativo que desarrolla en agar nutritivo con o sin enriquecimiento.

Listeria monocytogenes ha desarrollado diversos mecanismos que le posibilitan sobrevivir en condiciones extremas de pH, salinidad y temperatura.

Su temperatura óptima de crecimiento está entre los 30ºC y 37ºC, pero pueden crecer entre 18 a menos 4ºC en pocos días, rango éste que incluye las temperaturas de refrigeración, por lo que la infección puede ser transmitida incluso a través de alimentos refrigerados o congelados.

En cultivos viejos pueden aparecer en forma de filamentos de 6 a 20 µm de longitud. La movilidad a 28ºC está dada por 1 a 5 flagelos perítricos.

Las colonias en agar sangre son pequeñas, redondas, convexas y lisas de 1 a 2 mm de diámetro. Generalmente son hemolíticas, con zona clara de beta hemólisis muy marcada. Cuando se levanta la colonia se observa mejor esta beta hemólisis.

Al observarse con lupa con epi.iluminación, con ángulo de 45-60º, las colonias presentan un reflejo de color azul-verdoso sobre una superficie finamente granular.

Es un microorganismo parásito intracelular facultativo. Invade y se desarrolla dentro de los macrófagos y dentro de otro tipo de células, como las células epiteliales y fibroblastos.

La infec ción puede manifestarse:

- En el embarazo, como aborto espontáneo, muerte al nacer, nacimiento prematuro, retraso mental del bebe.
- La embarazada infectada puede manifestar síntomas leves semejantes a una leve gripe.
- En el recién nacido la enfermedad se puede presentar como:
  * Listeriosis neonatal, ya sea por contaminación trasplacentaria, manifestándose tempranamente como un síndrome séptico de inicio precoz asociado en general a prematuridad síndrome febril materno y/o corioamnionitis. Esta modalidad es de mayor gravedad y presenta mortalidad elevada (30 a 50%) se postula que surge como una infección adquirida intra útero.
  * La infección tardía (ocurre luego de la primera semana de vida) se asocia a parto de término no complicado. La manifestación más

frecuente de esta modalidad es la de meningitis, seguida por cuadro de sepsis.

* La meningitis, esta asociada a contaminación intraparto o inmediatamente antes del nacimiento.

En el caso de la listeriosis postnatal, está asociada a meningitis o septicemia en huéspedes con factores predisponentes como cáncer, alcoholismo, SIDA, diabetes, trasplantes y otras inmunodeficiencias.

Con excepción de la transmisión vertical de la madre al feto o de algún caso de contaminación cruzada en la sala de parto o en la unidad de neonatología, no se ha reportado aún infección de persona a persona.

Se trata de un microorganismo parásito intracelular facultativo que penetra en el huésped vía intestino.

La infección ocurre, en la mayoría de los casos, por vía intestinal.

> El camino al Daño

Es un patógeno intracelular facultativo capaz de invadir y sobrevivir dentro de las células de los mamíferos.

Ya se han descripto numerosos genes que codifican para diversas proteínas involucradas en la virulencia.

Entre ellas, la internalina, una proteína de superficie que interactúa con un receptor de adhesión, la E-cadherina sobre las células epiteliales humanas y conduce a la inducción de la fagocitosis. Las E-cadherinas son glucoproteínas específicas de los tejidos.

Una vez que ha sido fagocitada, listeria comienza a fabricar esta listeriolisina O.

La listeriolisina O es una toxina citolítica y hemolítica, codificada por el gen *hly* y activada por tiol, que se secreta a pH bajo y bajas concentraciones de hierro, condiciones éstas que se encuentran en el interior del fagolisosoma.

La listeriolina O es una hemolisina formadora de poros semejante a la estreptolisina O de los estreptococos del grupo A, que actua al unirse al colesterol de la membrana del fagolisosoma para formar los poros. A la formación de poros colaboran las fosfolipasas C muy asociadas con la virulencia al contribuir al daño de las membranas con la correspondiente citolisis, pudiendo la bacteria escapar al citoplasma donde prolifera y comienza a rodearse de filamentos de actina.

Lograda su llegada al citosol, otra proteína de la superficie de la bacteria, la ActA produce la polimerización intracelular de la actina, que le posibilita a la bacteria, una vez alcanzado el citoplasma, utilizar el citoesqueleto de la célula hospedadora para moverse en su interior.

Después de dos a tres horas, los filamentos de actina, que se polarizan hacia un extremo de la bacteria, la orientan y ayudan a migrar hacia la periferia de la célula, fenónemo aparentemente dirigido por la ActA que lo logra empujando la membrana celular y formando una protuberancia hacia la célula colindante en forma de evaginaciones citoplasmáticas que contienen en su extremo una bacteria que puede ser ingerida por las células adyacentes y queda encerrada en un fagosoma de doble membrana el que luego de romperse puede reiniciarse el ciclo. Se especula que en la rotura de este fagosoma interviene también la lecitina.

En síntesis es en el intestino, que las listerias atraviesan la barrera mucosa mediante una endocitosis de las células endoteliales, lisis de la vacuola fagocitica, desplazamiento en el citoplasma y diseminación a células vecinas. Mediante este mecanismo, las listerias pueden moverse de una célula a otra, diseminándose por los tejidos del huésped sin exponerse a la acción de los anticuerpos. La supervivencia intracelular lo logra escapando del fagosoma antes de su unión con el lisosoma (**Capítulo 1).**

Una vez en la sangre las bacterias se diseminan alcanzando el SNC y la placenta, dada una marcada predilección por esos sitios.

Da cuenta de la virulencia de esta citolisina, que la pérdida de su síntesis o de su función citolítica, produce un fenotipo avirulento en modelo animal.

Ya han sido identificados los genes que codifican moléculas necesarias para la invasión como autolisinas y proteínas fijadoras de fibronectina y las otras proteínas que intervienen en fases posteriores del ciclo intracelular como la ActA y la hemolisina o listeriolisina O.

Idéntico mecanismo ocurre en las shigellas al usar la actina para impulsarse a través del citoplasma de la célula infectada y propagarse a células vecinas **(Capitulo 7).**

Los genes de virulencia de *Listeria monocytogenes* se organizan dentro de islas de patogenicidad, las que adquiere la bacteria mediante transferencia genética , llamada – isla 1 de patogenicidad de *Listeria*- que alberga a seis de los genes que codifican factores de virulencia.

La expresión de muchas de las proteínas codificadas por estos genes depende de variadas señales ambientales como la temperatura, componentes del medio en que se encuentran, entre otros condicionantes.

Si bien siempre se asumió que los aislamientos de ambiente y de infecciones humanas respondían a un mismo patrón de virulencia, actualmente se estudia la participación de determinados factores de virulencia los que presentan variabilidad en su poder patogénico, por mutaciones de variados genes que codifican dichos factores según el origen de las cepas dando lugar a diversos serotipos con diferencias en su rol patogénico. Tema éste actualmente en investigación.

Diversos métodos de identificación de cepas y su caracterización en subtipos y grupos clonales son de utilidad en el conocimiento de su poder patogénico, y de brotes epidémicos y poder así prevenirlos durante la cadena de la producción de alimentos.

Diversos serotipos detectados por anticuerpos a los antígenos somáticos(O) y flagelares (H) fueron identificados en esta especie de *Listeria*.

El uso de técnicas moleculares posibilitó la identificación de subtipos contribuyendo así a la identificación de cepas y colaborando con la vigilancia epidemiológica, ya que no todos los serotipos identificados están involucrados en enfermedad en humanos.

Solo los serotipos denominados 4b,1/2a y 1/2b, se asocian al 90% de la listeriosis humana. Ha sido ya comunicado que entre el 8 y 21% de los aislamientos naturales de *Listeria monocytogenes*, provenientes de alimentos y del ambiente tienen su virulencia atenuada o son avirulentos. Esto apoya la idea de la variabilidad de la virulencia que se manifiesta por mutaciones en diversos genes que codifican proteínas involucradas en el daño al huésped.

El tratamiento de la listeriosis en cualquiera de los casos tiene como objetivo la erradicación de la bacteria del foco infeccioso.

Ampicilina es la droga de elección para el tratamiento de la infecciones provocada por *Listeria monocytogenes*. Ampicilina 200 mg / kg/ día repartida en dosis cada 6 hs en sinergia con gentamicina 15 mg /kg/ dia en monodosis cada 24 hs es considerado el tratamiento ideal en caso de meningitis.

Treponema pallidum

Esta bacteria es el agente etiológico de la sífilis.

La sífilis continúa representando una de las principales enfermedades de transmisión sexual en el mundo, tanto por su creciente frecuencia como

por la especial gravedad de su etapa terciaria, en la que ocurre la afectación del sistema nervioso central de los enfermos, etapa ésta poco frecuente en la actualidad según Primer Consenso de Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de las Enfermedades de Transmisión Sexual. SADI 2011.

Durante los últimos lustros, numerosos investigadores se han abocado a estudiar los factores de virulencia de *Treponema pallidum,* el agente causal de la sífilis, a fin de establecer los mecanismos de acción implicados en la patogenia y, con base en esos conocimientos, impulsar el diseño de vacunas capaces de erradicar a la enfermedad en el futuro cercano.

Los treponemas son microorganismos unicelulares helicoidales delgados, con espirales muy apretadas de 5 a 15 µm de largo y 0,09 a 0,18 µm de ancho.

Estas células largas, muy delgadas, no pueden visualizarse por microscopía óptica.

Para la visualización se debe recurrir a la iluminación de campo oscuro, contraste de fase, inmunofluorescencia o tinciones por impregnación argéntica.

No presentan esporas ni cilias. Se dividen transversalmente. Tienen una movilidad propia.

Se desplazan con un movimiento rotatorio flotante y un movimiento flexuoso u ondulante alrededor de su centro. Esta característica y su aspecto ahusado en un extremo orientado hacia la célula huésped cuando se inserta en ella, posibilita su identificación en la observación en campo oscuro y su diferenciación de otros treponemas no patógenos.

El citoplasma del microorganismo está rodeado por una membrana citoplasmática trilaminar, la cual está cubierta por una capa mucopeptídica interna, el periplasto compuesto por moléculas alternantes de N-acetilglucosamina y N-acetil-acido murámico, que confiere rigidez estructural.

La membrana lipoproteinica externa es muy permeable y osmóticamente sensible.

De afuera hacia dentro, la estructura de el treponema está constituida por:

- una envoltura celular, llamada “sobre celular” compuesta por proteínas, lipoproteínas, polisacáridos, fosfolípidos (cardiolipinas).

Esta envoltura externa contiene pocas proteínas de superficie expuestas. Debido a ello los treponemas disminuyen sus sitios blancos de exposición al sistema inmune del huésped, el que no los reconoce. Esta particula-

ridad, por la que son llamados microorganismos "furtivos", los hace pasar desapercibidos para las defensas del huésped.

La ausencia de mucopéptidos en esta envoltura o "sobre celular" diferencia a los treponemas de la pared celular de otras bacterias.

- pared celular y membrana citoplasmática. Ambas encierran al cilindro protoplasmático llamado también "protoplasto".

Es decir que el protoplasto está envuelto por el "sobre", la pared y la membrana citoplasmática, que forman un complejo semejante a las bacterias gramnegativas, que cumple funciones primordiales en la absorción y excreción.

La forma espiral de el treponema consta de seis fibrillas, tres de las cuales emergen en cada extremo de la bacteria enrollado al cuerpo celular.

Las fibrillas axiales o flagelos, constituyen los órganos de motilidad de los treponemas, son morfológicamente semejantes a flagelos y están relacionados no sólo con la motilidad sino con el tipo de movimiento.

Este movimiento se caracteriza por su rotación sobre su eje mayor, en sacacorcho, dato de importancia en el diagnóstico directo del microorganismo al observarlo con microcopio de campo oscuro.

En esta complejidad estructural, se destacan cuerpos electrónicamente densos, que semejan a "cabezas de serpientes" donde se insertan las fibrillas o flagelos, llamados blefaroplastos.

Los extremos de la célula son afilados y en ellos se insertan tres fibrillas.

En algunos aspectos de su estructura *T. pallidum* se parece a las bacterias gramnegativas, pero se diferencia, fundamentalmente por no reproducirse adecuadamente en medios de cultivos artificiales y el no poder contar con un modelo animal adecuado para estudios de infección.

No crece en medios de cultivos libres de células.

Es un parásito obligado, siempre resguardado de la luz y la sequedad pues fuera de la célula del huésped, muere antes de las dos horas.

La habilidad de el treponema para persistir en el huésped infectado, ha sido asociada al soma rodeado de fosfolípidos y baja concentración de proteínas de membrana, unido a la lenta multiplicación dentro del organismo.

La capa de peptidoglucano y la sensibilidad a la penicilina, son sus características.

El treponema carece de lipopolisacaridos y sí tiene numerosas lipoproteinas que actúan como poderosos proinflamatorios que actuan (in vi-

tro) con monocitos, macrófagos, linfocitos y células endoteliales ayudados por el peptidoglucano y los glucolípidos.

La membrana externa treponémica corresponde a una lábil bicapa de fosfolípidos, en la que se encuentran inmersas diversas proteínas transmembranales de baja inmunogenicidad, a las cuales se conoce como TROMPs y actúan como porinas. Su baja densidad y escasa concentración determinan un muy lento paso de sustancias hacia el citoplasma microbiano; esto último se relaciona, tanto con la incapacidad del microorganismo para crecer en medios artificiales, como con su prolongado tiempo de generación, de 30 a 33h.

La llamada TROMP1 es una porina clásica pero, además, su estructura primaria es muy similar a la de una familia de adhesinas estreptocócicas, lo que también sugiere su posible coparticipación en la adherencia de *T. pallidum* a los tejidos humanos; por su parte, la TROMP2 sólo parece desempeñarse como porina.

> El camino al Daño

Treponema pallidum es responsable de enfermedad solamente en humanos, aunque los conejos pueden ser infectados experimentalmente.

Sólo se trasmite por contacto personal (incluida la vía transplacentaria), dada su exagerada sensibilidad a la desecación y a las temperaturas ajenas al rango de los 35 a 37 ºC.

Treponema pallidum es una espiroqueta anaerobia que penetra en el organismo humano a través de escoriaciones, heridas, fisuras que se producen durante las relaciones sexuales y a partir de allí se disemina por todo el organismo utilizando la vía linfohematica.

Puede también ser trasmitido por la sangre y a través de la placenta. Se trata de un microorganismo, parásito obligado.

El treponema atraviesa rápidamente las mucosas íntegras o con soluciones de continuidad de la piel e invade el tejido linfático.

La incubación es de 21 dias para un inóculo de 500 a 1000 microorganismos y es inversamente proporcional al tamaño del inóculo.

La sífilis es una enfermedad de transmisión sexual que afecta a muy diversas regiones anatómicas, incluídos los vasos sanguíneos y las áeras perivasculares.

Es una enfermedad que produce una marcada afectación sistémica acompañada de un amplio rango de manifestaciones clínicas "anodinas" por lo que es llamada "la gran enfermedad simuladora".

Su período de incubación es de 10 a 90 días y el proceso evoluciona gradualmente dando lugar a varias etapas activas y a un prolongado periodo de latencia.

Si bien muchos genes están asociados con la virulencia de este microorganismo, no está aún dilucidada la función que juegan en ella.

Proteínas de membrana externa se asocian con la adherencia a superficies de las células del huésped y la producción de hialuronidasa puede facilitar la infiltración perivascular al penetrar células endoteliales y membranas intactas con la consecuente diseminación del microorganismo.

La principal proteína lipídica de la membrana externa, fue asociada a la patogenicidad hacia la década del 90, ya que induce moléculas de adhesión, activa la serie monocito/macrófago, la síntesis de factor de necrosis tumoral (FNT) y las interleucinas 6, 8 y 12, de importancia en la respuesta inflamatoria.

La protección contra la fagocitosis, puede explicarse por la capa de fibronectina del huésped que cubre a las espiroquetas.

Una vez que atraviesa la membrana mucosa, intacta o la piel erosionada, entra en los linfáticos o en el torrente sanguíneo y se disemina por todo el organismo.

Treponema pallidum se aloja en los espacios intracelulares, en la cercanía de pequeños vasos, en neutrófilos, macrófagos, células endoteliales y perivasculares.

Se ha demostrado que se activa la respuesta inmune celular debido a la fagocitosis y degradación que experimenta el treponema, liberando lipoproteínas microbianas e interactuando éstas con receptores celulares, acciones que determinan la secrecion de citocinas proinflamatorias.

Siendo la piel y las membranas mucosas los lugares de inicial contacto, el sistema inmune se pone en contacto con él a través de las células dendríticas e inicia asi una respuesta celular T.

Diversos tipos de células T y diversas citocinas IL-2, IL12, FNT son los que activarán macrófagos y la destrucción bacteriana en la enfermedad temprana.

Linfocitos T de otras categorías serán los responsables de mantener la inmunidad hacia las reinfecciones en la sífilis tardía.

Es importante la inmunidad humoral que es la que confiere protección pasiva al feto al inhibir la adherencia y posterior invasión de el treponema,

favoreciendo la fagocitosis por macrófagos e induciendo la acción bactericida del complemento que depende de los anticuerpos.

La virulencia, en general esta asociada a varios factores:

- La capacidad de la bacteria para moverse por diversas mucosas e invadir el cuerpo.
- El tipo de novilidad que le posibilita atravesar distintas capas tisulares(movilidad en sacacorcho).
- La capacidad para atravesar la placenta.

Se postula que la membrana externa, a pesar de ser poco inmunogénica, realiza la función primordial en la patogénesis y en la inmunidad, ya que participa en la adherencia y funciona como blanco de anticuerpos opsonizantes.

Además se asocia al acceso del microorganismo hacia diferentes nichos humanos, acceso que depende de la quimioatracción, fundamentalmente a sus tres tipos de movilidad:

- hacia una dirección y la contraria
- la movilidad en sacacorcho
- la movilidad basada en contracción y elongación de sus fibrillas axiales.

Las lesiones histológicas características de la sífilis son semejantes independientemente del órgano afectado y de condición del paciente, adulto, niño o feto.

Una infiltración perivascular llevada por linfocitos, células plasmátiicas, histiocitos con respuesta inflamatoria como consecuencia de ello y con compromiso sistémico que exhibe hepatoesplecnomegalia, hepatitis neonatal, síndrome nefrótico, neumonitis y otras severas manifestaciones como la meningoencefalitis del neonato infectado son de severas consecuencias.

Si bien se trata de una bacteria de lento crecimiento, puede evadir extraordinariamente las respuestas celular y humoral del hospedero.

Diversas evidencias recientes indican que la inmuno-evasión llevada a cabo por *Treponema pallidum* se debe fundamentalmente a su exclusiva arquitectura molecular y a su capacidad para recubrirse con proteínas u otras sustancias propias del hospedero, tales como la fibronectina, las inmunoglobulinas IgG, la glucosa y la transferrina. Esta particular arquitectura del microorganismo se asocia a su baja inmunogenicidad; una gran cápsula

(periplasto) de mucopolisacáridos recubre a los antígenos superficiales, lo que impide la detección inmunológica correspondiente.

Los anticuerpos treponémicos, específicos para antígenos treponémicos: estos anticuerpos llamados "cicatriz inmunológica", se producen continuamente durante décadas pudiendo ser detectados aun después de un tratamiento y curación.

Los anticuerpos no trepònémicos, o anticardiolipina, descubierto por Wasserman en 1907, se hacen detectables una o dos semanas después de iniciado el chancro y **disminuyen su concentración** a niveles indetectables laboratorialmente durante las fases tardías de la enfermedad. Unicamente un 70% de los pacientes con sífilis cardiovascular o neurosífilis muestran una prueba no treponémica positiva. Cuando el tratamiento fue exitoso este anticuerpo disminuye hasta niveles de 1:2 o indetectables.

La ruta que tomen estos microorganismos luego de ser capturados, será determinante en el tipo de lesiones que produzcan, procesos patológicos y sobrevivencia por períodos muy prolongados.

La fagocitosis de el treponema es semejante a la fagocitosis de otras bacterias, dependiendo del tipo de célula fagocitaria y del medio donde se encuentre, lo que determinará su destino, si es eliminado, digerido o aislado.

Los mecanismos por los cuales estos microorganismos evaden las defensas del huésped durante un período de años, no se conocen claramente.

La imposibilidad de cultivar in vitro esta bacteria, dificulta el estudio y análisis de sus aspectos metabólicos, físicos y los asociados a la patogenia.

Los pacientes que padecen sífilis pueden ser diagnosticados en los siguientes estadios:

* Sífilis Primaria:

El paciente presenta signos y síntomas de infección que aparecen (entre 9-90 días del contacto infectante). Este estadio se manifiesta por la presencia de úlcera o chancro en el sitio de inoculación.

El chancro es una lesión erosiva de consistencia firme a la palpación e indolora de 2 cm de extensión, de límites netos, borde regulares, de fondo rojo, limpio, húmeda, con escasa secreción serosa, rica en treponemas, por lo tanto sumamente infectante.

El chancro se asienta en el surco balanoprepucial, cara interna del prepucio, frenillo, glande y piel del prepucio, es decir áreas de mayor fricción durante el coito.

En la mujer es menos frecuente observarlos por razonas anatómicas y por su carácter indoloro. Se asientan preferentemente en los labios mayores, o menores, horquilla vulvar y el clítoris.

Adenopatías satélites se presentan alrededor de 7 a 10 días luego de la aparición del chancro y pueden persistir por semanas, luego de su cicatrización.

Los ganglios están aumentados de tamaño, son firmes, indoloros, sin signos de flogosis no adheridos entre si, ni a planos superficiales, ni profundos y habitualmente son bilaterales.

* Sífilis secundaria:

Se manifiesta luego de 45 a 60 días de haber aparecido el chancro. Hay un período de transición libre de lesiones activas existentes, entre el final de la sífilis primaria y la aparición de las primeras lesiones del secundarismo.

El secundarismo se caracteriza por presentar brotes de lesiones múltiples y polimorfas generalizadas, son sumamente contagiosas y son de resolución espontánea.

Las lesiones típicas son máculas eritematosas, redondeadas u ovales. En algunas ocasiones son levemente pruriginosas, de 1 a 2 cm. de diámetro, de límites difusos, no descamativas ni confluentes. Son indoloras y desaparecen con la vitropresión.

Las roséolas se disponen en tronco, cuero cabelludo, respetando cara, palmas y plantas, Duran aproximadamente 1 mes, de no mediar tratamiento, estas lesiones son recidivantes pero tienen un diámetro mayor y en menor número con disposición regional.

Las lesiones papulares suceden a la roséolas y son las manifestaciones más típicas del secundarismo. Aparecen en brotes, son firmes a la palpación, de color rosada o bien rojas cobrizas, se localizan preferentemente en la margen de implantación del cuero cabelludo, tronco, zonas peribucales y ano-genital, palmas y plantas.

Las lesiones mucosas junto con los condilomas planos, son las fuentes más importantes de contagio.

En la boca se presentan lesiones eritematosas que pronto se erosionan y luego son cubiertas por una seudomembrana blanquecina, se disponen en la mucosa de labios, velo del paladar, mucosa yugal y pilares amigdalinos.

En dorso de lengua se manifiestan como áreas despapiladas.

Se pueden detectar treponemas en todas las lesiones dermatológicas correspondientes a este período de la sífilis, sin embargo la serología no treponémica es el procedimiento de laboratorio más utilizada en esta etapa.

Evolución: todas las manifestaciones del secundarismo sifilítico tienden a involucionar lentamente hasta desaparecer, pero si no se tratan existen recurrencias periódicas.

* Sífilis asintomática o latente:

Variedad asintomática de sífilis, se caracteriza por poseer pruebas serologías reagínicas reactivas, confirmadas por serologías treponémicas, también reactivas y sin manifestaciones clínicas de enfermedad.

Es una forma activa de sífilis, que abarca el período comprendido desde la desaparición de las lesiones de la etapa secundaria hasta la exteriorización de las primeras manifestaciones del terciarismo.

Con fines epidemiológicos, de pronóstico y tratamiento, se clasifica a la sífilis latente en reciente y tardía.

La sífilis serológica temprana comprende el período previo a 1 a 2 años desde la infección, puede ser contagiosa por recurrencia tardía de lesiones de sífilis secundaria.

La mujer embarazada tiene grandes posibilidades de dar a luz un hijo con sífilis.

En este período es de esperar que la VDRL se torne no reactiva dentro de los 2 años de haber recibido tratamiento adecuado.

Sífilis serológica tardía es la que se extiende mas allá del primer y segundo año, no es contagiosa y la VDRL presentará una disminución progresiva de los títulos, pero no será negativa antes de los 2 años de haber recibido un tratamiento adecuado.

* Sífilis terciaria:

Después de años de haberse iniciado la enfermedad y cuando se quiebra el silencio clínico de la sífilis latente tardía, aparecen las manifestaciones correspondientes a la sífilis terciara.

Esta forma infrecuente, en la actualidad se divide en grave cuando se comprometen el SNC, aparato cardiovascular y en benigna cuando involucra piel, mucosas (gomas, tubérculos) y resto de los órganos internos.

El diagnóstico de la sífilis terciaria, se apoya en la clínica, el análisis histopatológico y las pruebas de laboratorio, especialmente las treponemicas, porque un tercio de los pacientes pueden presentar VDRL no reactivas.

* La sífilis congénita

La sífilis congénita resulta por la transmisión transplacentaria de la bacteria al feto.

Ocurre por la diseminación hematógena de el treponema desde la gestante infectada al feto.

Con frecuencia se trata de una enfermedad de curso severo.

Si bien hubo hacia el año 1497, documentados casos de la enfermedad en lactantes, fue Paracelso en 1536 el primero que sugirió la transmisión de la sífilis de padre a hijo, por herencia.

Luego de numerosas teorías y supuestos acerca de esta enfermedad, recién a inicios del siglo XX, y mediante el diagnóstico utilizando el test de fijación de complemento de Wassermann aparece la confirmación de la sífilis congénita en hijos de madres infectadas.

Esta bacteria puede atravesar la placenta a partir de la décimo sexta semana de gestación, liberándose hacia la circulación fetal, resultando en una espiroquetemia con un elevado grado de diseminación.

También al nacer los bebes tienen apariencia normal, a excepción de menor peso, anemia leve y la presencia de hepato-esplecnomegalia.

Esta condición clínica del bebé corresponde a la etapa secundaria de la sífilis, ya que la etapa primaria ocurre in utero y recién luego de 2 a 4 semanas aparecen las primeras manifestaciones manifestaciones clínicas. Posteriormente aproximadamente a los 2 años de edad aparece la etapa terciaria.

Los síntomas del recién nacido, si bien pueden variar, son:

- Incapacidad para aumentar de peso
- Retraso en el desarrollo
- Ausencia de puente nasal o nariz en forma de silla de montar
- Fiebre
- Irritabilidad
- Erupción en genitales, boca y ano
- Erupción cutánea en variadas localizaciones
- Secreción nasal acuosa

Las complicaciones :

- Ceguera
- Sordera
- Deformación de la cara
- Problemas del sistema nervioso

Es importante recordar que:

- Muchos recién nacidos infectados a comienzo del embarazo no sobreviven.
- Las manifestaciones tardias clásicas ocurren en niños no tratados los que manifiestan fundamentalmente afectación del SNC, huesos, dientes, ojos y piel.
- El tratamiento de la embarazada disminuye el riesgo de sífilis congénita.
- Los recién nacidos infectados al atravesar el canal del parto, tienen mejor pronóstico.
- La mejor prevención pasa por prácticas sexuales sin riesgo.
- El cuidado prenatal es fundamental, el que se realiza con un examen de sangre rutinario para la detección de la enfermedad lo que permite recibir tratamiento al bebe y la madre.
- Los recién nacidos de madres infectadas, que recibieron tratamiento adecuado con penicilina durante el embarazo, tienen un riesgo mínimo de padecer sífilis congénita.

Se trata de una enfermedad asociada a la pobreza y al bajo nivel de instrucción de las madres lo que tiene como consecuencia deficiencias en los controles prenatales, como así también en el cumplimiento de las indicaciones y sugerencias de la promoción de la educación para la salud sexual y reproductiva.

En Misiones, Departamento Capital, en el período 2005 al 2008, se registró una de las tasas de incidencia más elevadas en el país (10,79 por mil nacidos vivos).

Si bien se detectó una tendencia decreciente desde 2007, los valores registrados superan ampliamente los valores recomendados por OPS/OMS de 0.5 casos por mil nacidos vivos. (Incidencia y Distribución de la Sífilis Congénita en Misiones (Argentina) Tesis Doctoral Dr Jorge Deschutter. Editorial Universitaria LOS TESISTAS ISBN 978´-950-579-227-6. Editorial Universitaria de la Universidad Nacional de Misiones. 2011. Apunta :

Los factores de riesgo:

- Se destaca como principal factor de riesgo en la sífilis de la gestante, la carencia de controles prenatales.
- El subregistro en la notificación de casos de sífilis congénita, contribuye a la infraestimación de la enfermedad.

La sífilis es una enfermedad crónica que se contagia por contacto directo, transfusiones o transmisión vertical de la madre al feto.

La sífilis continúa representando una de las principales enfermedades de transmisión sexual en el mundo, tanto por su creciente frecuencia como por la especial gravedad de su etapa terciaria, en la que ocurre la afectación del sistema nervioso central de los enfermos.

La sífilis continúa siendo una de las principales enfermedades de trasmisión sexual ocasionada por bacterias.

Independientemente de la frecuencia asociada a cada país, la sífilis obedece a factores predisponentes que impactan de diferente manera según cada región, como:

- El inicio temprano de las relaciones sexuales.
- La disminución de los niveles socio-económicos y culturales de los grupos de mayor riesgo.
- La mayor movilidad de la población como consecuencia de la industrialización y urbanización y los casos de trabajadores migratorios, turismo y guerras.
- El uso de anticonceptivos hormonales que incrementó los contactos sexuales.
- Un insuficiente acceso a los servicios de salud.
- El intercambio sexo por drogas.
- La dificultad para localizar al caso índice.

Los casos más vulnerables continúan siendo los jóvenes, emigrantes, viajeros, trabajadores golondrinas, sexoservidores y los de situación economica precaria.

Tratamiento

Sífilis en la embarazada:

Penicilina G benzatínica 2.400.000 UI por vía IM semanal, 3 dosis.

En mujeres alérgicas se recomienda la desensibilización a la penicilina.

Sífilis congénita:

Caso confirmado o presuntivo (según edad del diagnóstico).

Edad < 7 días: Penicilina G cristalina 100.000 U/kg/día vía IV en 2 dosis por 10 días.

Edad 7-28 días: Penicilina G cristalina 150.000 U/kg/día vía IV en 3 dosis por 10 días.

Edad > 28 días: Penicilina G cristalina 200.000-300.000 U/kg/día vía IV en 4 dosis por 10 días.

Sífilis congénita de diagnóstico tardío y/o retratamiento:

En niños se recomienda penicilina G acuosa 200.000-300.000 U/kg/día (50.000 U/kg cada 4 a 6 horas) por 10-14 días (dosis máxima 24 millones U).

Algunos autores sugieren indicar a continuación 1 dosis de penicilina G benzatínica.

Micoplasmas genitales

El primer aislamiento humano de micoplasma realizado por Dienes fue en el año 1937. Lo aisló de un absceso de glándula de Bartholin.

El mismo Dienes describe luego en el año 1954 el primer aislamiento de micoplasma de una secreción uretral de un paciente que padecía uretritis no gonocócica. Se trataba de un micoplasma con capacidad de hidrolizar la urea y se lo identificó como *Ureaplasma urealyticum.*

Todos los micoplasmas se encuentran taxonomicamente en la clase Mollicutes, orden Mycoplasmatales, Familia Mycoplasmataceae, Género *Mycoplasma.*

Las especies que veremos en este capitulo son: *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum.*

Se trata de microorganismos, varios de ellos, integrantes de la microbiota esporádica o transitoria.

Las principales características del género son:

- ausencia de pared celular, (por lo que no pueden ser visualizados por la coloración de Gram).
- marcado pleomorfismo.
- esteroles en la membrana externa.
- son contaminantes frecuentes en los laboratorios por el pequeño tamaño, de 0,2 a 0,3 μm. lo que les posibilita atravesar porosidades que retienen bacterias, con lo que se transforman en contaminantes frecuentes en laboratorios de cultivos celulares diversos.
- el requerimiento de suero para su desarrollo en el laboratorio.
- en general los integrantes del género son exigentes desde el punto de vista nutricional, precisando diversos nutrientes que deben ser agregados al medio de cultivo para su crecimiento.
- el tiempo de multiplicación de 12 hrs o más para la mayoría de ellos.

Se diferencian de los virus por contener tanto ARN como ADN y de las bacterias, por carecer de pared celular.

Los ureaplasmas desarrollan en forma de colonias muy pequeñas de 15 a 60 μm de diámetro.

Las colonias de *Mycoplasma hominis* alcanzan a 200 a 300 μm de diámetro.

No obstante, el tamaño de las colonias, no es una ayuda confiable para la identificación, dado que el aumento del volumen de agar y el buffer del medio de cultivo modifican estos tamaños.

Se ha encontrado a *U. urealyticum* en la orina de pacientes con cálculos renales, más frecuentemente que en pacientes con cálculos de origen metabólico.

La detección de los micoplasmas genitales depende de un medio de cultivo apropiado y de rápidas pruebas de identificación como:

- la producción de ureasa por parte de ureaplasmas que eleva el pH del medio.

- el sistema de arginina dehidrolasa que transforma la arginina en ornitina con la liberación de NH_3 lo que también eleva el pH.

Es en agar sangre suplementado, donde *M. hominis* crece dando colonias no hemolíticas bien definidas. El agregado de antimicrobianos, los preserva del sobrecrecimiento bacteriano.

Además de la mayor adherencia y mayor destrucción de las membranas celulares por estos productos, a la enzima ureasa se le atribuye que podría inducir la precipitación de cristales de fosfato de calcio, responsables de la formación de cálculos en animales de experimentación.

Desde la colonización cervical, los micoplasmas pueden ser llevados por los espermatozoides o por otros patógenos como gonococo o *Chlamydia trachomatis*, hasta las trompas sanas o previamente infectadas.

La colonización se inicia en el momento del parto y luego disminuye para aumentar con las relaciones sexuales. La colonización está relacionada con la edad, bajas condiciones socio- económicas y prosmicuidad, entre otras causas.

En la mujer asintomática se encuentran en la mucosa genital, pero no en vejiga ni en útero ni en trompas de Falopio.

En el varón adulto asintomático se encuentran en el semen, orina y uretra.

U. urealyticum y *M. hominis* se han aislado en el 40 a 80% y en el 20 a 30%, respectivamente, de mujeres sexualmente activas, asintomáticas.

La recuperación de *M. hominis* y de ureaplasmas de la vagina o uretra masculina, no tiene significancia, en la mayoría de los casos.

La recuperación de estos microorganismos de sangre, heridas, articulaciones, y otras zonas extragenitales, sí tiene significancia.

A pesar que se comportan como comensales, pueden producir enfermedades de diversa severidad.

Los micoplasmas no producen vaginitis pero se asocian a la vaginosis bacteriana en mujeres que la padecen más frecuentemente que en aquellas sin vaginosis.

Se los recupera más frecuentemente de mujeres embarazadas que de no embarazadas y con menor frecuencia luego de la menopausia, lo que hace suponer alguna participación de las hormonas sexuales en la colonización.

Si bien son co-patógenos de cervicovaginitis y/o vaginosis, producen severas complicaciones en el tracto cervical superior llevando a la EPI

(enfermedad pélvica inflamatoria) endometritis, infertilidad, endometritis posparto y poscesárea. Las infecciones perinatológicas son de severidad.

Ureaplasma urealyticum cuando se encuentra en la vagina de mujeres sanas, la tasa de trasmisión vertical es del 20 a 50 %.

> El camino al Daño

Si bien la colonización del recién nacido es transitoria generalmente, puede producir neumonía en el feto y recién nacido en especial en los prematuros o de bajo peso al nacer (BPN), menor a 1,250 grs.

La infección que *U. urealytricum* produce en el recién nacido se relaciona con el desarrollo de enfermedad pulmonar crónica cuando se trata de un neonato de bajo peso al nacer.

A los ureaplasmas y *M. hominis*, al ser integrantes de la flora transitoria, no siempre es fácil atribuirles responsabilidad en determinado proceso patogénico.

Ambos, *Mycoplasma hominis* y *U urealyticum* producen proteasas para la inmunoglobulina A que hidroliza la IgA, facilitando su invasión.

Además la enzima ureasa que producen, al hidrolizar la urea, libera amonio que daña las células adyacentes, produce citonecrosis. Este amonio puede llegar a las trompas de Falopio y producir necrosis de cilias con la consecuencia infertilidad. A una mayor destrucción de las membranas celulares por estos productos se agrega que la enzima ureasa podría además inducir la precipitación de cristales de fosfato de calcio, responsables de la formación de cálculos en animales de experimentación.

A esta actividad de la ureasa, se agregan otros determinantes de virulencia como la IgA proteasa mencionada antes que destruye la IgA de las mucosas, (primera defensa en ellas).

Los ureaplasmas alteran la producción de prostaglandinas, necesarias para la implantación y mantenimiento del embarazo.

En ambos microorganismos se describieron proteínas de citoadherencia que favorecen la citoadherencia a las células eucariotas.

Aportan al daño las concentraciones de fosfolipasas A1 A2 y C ubicadas en la membrana citoplasmática y que, en embarazadas, pueden, al degradar fosfolípidos de las membranas fetales, promover la excesiva liberación de ácido araquidónico que produce la estimulación de la síntesis de las prostaglandinas las que pueden inducir un parto prematuro con am-

nionitis y morbimortalidad perinatal (abortos espontáneos, prematuridad, parto de niño muerto).

Se especula que la menor recuperación de micoplasmas del aparato genital de lactantes varones, que de lactantes niñas, es debida a que la mucosa genital del varón está menos expuesta.

Se han recuperado ureaplasmas de los genitales de hasta un tercio de lactantes de sexo femenino y en porcentaje menor, también *M. hominis*.

U. urealyticum se asocia a prostatitis, uretritis, epididimitis, cervicitis, abortos espontáneos, infertilidad, donde se lo ha recuperado en concentraciones elevadas, sólo o junto a *M. hominis.*

También *M. hominis* se ha recuperado de salpingitis y pelviperitonitis, sólo o asociado con otros microorganismos y se reconoce como agente etiológico de infecciones en inmunosuprimidos, (SIDA, agammaglobulinemia) en meningitis y neumonía en el recién nacido.

La mayor adherencia de estos microorganismos está sustentada por la demostración de proteínas de citoadherencia que son responsables del inicio de la colonización y la infección.

Producen también otra proteína asociada a la adherencia que se encuentra expuesta en la superficie denominada antígeno Vaa (variable asociado con virulencia) codificada por genes varios diversos cuya expresión se activa o desactiva, lo que favorece la diseminación del micoplasma de una célula a otra.

La infección que *U. urealyticum* produce en el recien nacido se relaciona con el desarrollo de enfermedad pulmonar crónica cuando se trata de un neonato de bajo peso al nacer.

U. urealyticum induce la producción de citocinas inflamatorias, tanto interleucina 6 como factor de necrosis tumoral (FNT), lo que contribuye a la respuesta inflamatoria y a la patología de la enfermedad pulmonar crónica.

Por todo ello y teniendo en cuenta la frecuencia de aislamientos de *U urealyticum* en la mujer fértil, solo es recomendable la investigación del microorganismo en el recién nacido prematuro y de menos de 1,250 grs de peso, si éste presenta distress respiratorio al nacer o un cuadro de neumonía o sepsis en ausencia de una etiología definida, como displasia broncopulmonar y enfermedades de mayor severidad como meningitis y bacteriemias.

En los neonatos prematuros o inmaduros la colonización con ureaplasma está asociada con el deterioro crónico de los tejidos pulmonares ya

sea directa o indirectamente con el desarrollo de la enfermedad respiratoria crónica de recién nacidos prematuros.

Otras localizaciones en el recién nacido pueden ser a nivel de nasofaringe, aparato genital y tracto gastrointestinal.

El feto puede adquirir el microorganismo intra útero o en el canal del parto si el mismo está colonizado o infectado.

La adquisición más frecuente del microorganismo por el feto es por infección previa de la cavidad amniótica. *(Ureaplasma urealyticum* debe investigarse en todo neonato con sospecha de sepsis neonatal).

Tratamiento sugerido para la mujer embarazada y recién nacido con infección por *Chamydia* spp. (**Capitulo 3).**

La infección por *Mycoplasma* comparte características con *Chlamydia trachomatis* en el tratamiento del neonato donde la eritromicina se considera el tratamiento electivo- Existe alguna experiencia con el uso de claritromicina y también se reporta el uso de clindamicina para el tratamiento de *Mycoplasma genitalium-*

No debo finalizar este apartado sin mencionar lo recalcado en infecciones del tracto genital (ITG) sobre clamydias… En neonatos, el pasaje de clamydia por el canal del parto de una madre infectada , puede producir en el recién nacido un cuadro de ophtalmia neonatorum o conjuntivitis del recién nacido, cuadro éste que puede ser seguido por una neumonía intersticial bilateral. Otras localizaciones en el recién nacido pueden ser a nivel de nasofaringe, aparato genital y tracto gastrointestinal.

El laboratorio ■ margarita laczeski

El niño puede adquirir infecciones de origen materno durante el embarazo, en el período perinatal o posnatal; en este sentido el laboratorio cumple una función fundamental en la prevención (diagnóstico materno) y detección (en el niño) a través del diagnóstico precoz.

La infección congénita (durante el embarazo, "*in útero"*), las infecciones perinatales (de ocurrencia alrededor del alumbramiento) y las posnatales (por ejemplo por transmisión de microorganismos durante la lactancia materna), constituyen un verdadero problema de salud pública.

Actualmente los esfuerzos se encuentran dirigidos para prevenir estas infecciones, principalmente con la realización de pruebas de tamizaje serológico durante el embarazo, el tratamiento adecuado ante su detección y el diagnóstico precoz en el recién nacido.

La infección adquirida durante el embarazo puede cursar de forma asintomática o inaparente en la madre o incluso puede colonizar el tracto genitourinario y gastrointestinal de la mujer embarazada y sin embargo causar infecciones severas en el niño.

Durante la concientización de la utilidad de la prevención y el diagnóstico precoz de estas infecciones, se han desarrollado técnicas altamente sensibles, específicas y rápidas que permiten asegurar un diagnóstico confiable y avanzar hacia la disminución de su incidencia.

En este capítulo se describe el diagnóstico de laboratorio de las infecciones perinatales más significativas por su morbilidad y mortalidad, con especial énfasis en las metodologías de laboratorio disponibles y ampliamente difundidas.

Además se transmite en este capítulo, la experiencia en *Streptococcus agalactiae* (SGB) de la Cátedra de Bacteriología, de la Universidad Nacional de Misiones, la cual durante una década, trabajó exitosamente bajo la dirección de Marta Vergara en el diagnóstico de colonización materna para prevenir la infección neonatal, el estudio de la sensibilidad a macrólidos; dando los primeros pasos además, para toda la región noreste del país, en la caracterización molecular de la resistencia y la virulencia de cepas de SGB y detectando el serotipo IX de SGB por primera vez en Argentina.

La mencionada labor de investigación se inició en el año 2004, con un verdadero compromiso social, iniciando, fortaleciendo y compartiendo con otros profesionales nacionales una verdadera pasión por el trabajo serio y responsable con el otro, acompañando el proceso de sanción de la Ley 26.369, (que reglamenta la búsqueda de SGB en toda mujer embarazada entre las 35 – 37 semanas) y que movilizó a toda la Argentina, luego de la muerte de hermanos gemelos producida a causa esta severa enfermedad neonatal en setiembre del año 2002.

Actualmente nuestra Cátedra continúa con esta labor, a través del proyecto de investigación de factores de virulencia en cepas invasivas de SGB, que dirijo, en un intento por ayudar a comprender mejor la patogenia de este microorganismo y aportar a logros concretos en su prevención. Esta labor, forma parte además, del proceso de formación en mi carrera de doctorado enfocada a caracterizar molecularmente la virulencia y la resistencia en SGB.

Streptococcus agalactiae (SGB)

El CDC (Centers for Disease Control and Prevention), en sus recomendaciones publicadas desde 1996 y años subsiguientes, para prevenir la infección perinatal por SGB, orienta a la búsqueda del microorganismo en la mujer embarazada a término (35 – 37 semanas de gestación) y la posterior aplicación de la PIP (Profilaxis Intra-Parto) a las colonizadas.

En este contexto, el laboratorio de bacteriología, aporta a la prevención de la infección perinatal por SGB, inicialmente con la búsqueda de portación materna.

Obtención de la muestra

SGB forma parte de la población bacteriana habitual del intestino y desde allí es capaz de colonizar el tracto genital de manera intermitente. Debido a ello se estableció el momento para obtención de la muestra en un período próximo al nacimiento (35 – 37 semanas de embarazo).

La muestra se toma del tercio anterior de vagina con hisopo estéril y simultáneamente con otro o el mismo hisopo de la zona ano – rectal. Si se utiliza el mismo hisopo para ambas zonas (genital y perianal), respetar la secuencia tomando siempre primero la muestra vaginal.

La paciente no debe tomar antimicrobianos días antes y durante la toma de muestra, salvo indicación médica.

Debe restringirse la aplicación de óvulos germicidas 72 hs. antes de obtener la muestra de hisopado vagino-rectal.

Obtenida la muestra debe enviarse inmediatamente al laboratorio para su procesamiento, de no ser posible colocar en medio de transporte Stuart (existen dispositivos comerciales adecuados).

Procesamiento de la muestra

El hisopo vagino-rectal se siembra en 1 – 2 ml de caldo Todd-Hewitt suplementado con colistín (10 µg/ml) y ácido nalidíxico (15 µg/ml). El caldo sembrado se cultiva 18 – 24 hs en estufa a 35°C.

Para realizar el aislamiento de SGB, luego de las 18 – 24 hs se repica el caldo Todd-Hewitt cultivado con la muestra a una placa de agar san-

gre ovina al 5% o medios cromogénicos para SGB, con técnica de siembra para aislamiento quemando el ansa entre estrías.

Estas placas se cultivan en estufa durante 24 hs. Si se utilizó placa de agar sangre ovina se emplea cultivo en microaerofilia (atmósfera húmeda con 5 – 10% de CO_2, método alternativo de lata con vela y algodón humedecido con agua). Si la siembra se realiza en agar cromogénico, incubar en aerobiosis.

Luego de la incubación se toman las colonias beta-hemolíticas o no (existen 2 – 5% de SGB con hemólisis alfa o no hemolíticas), previa coloración de Gram (confirmar morfología y tinción como cocos grampositivos) y catalasa negativa.

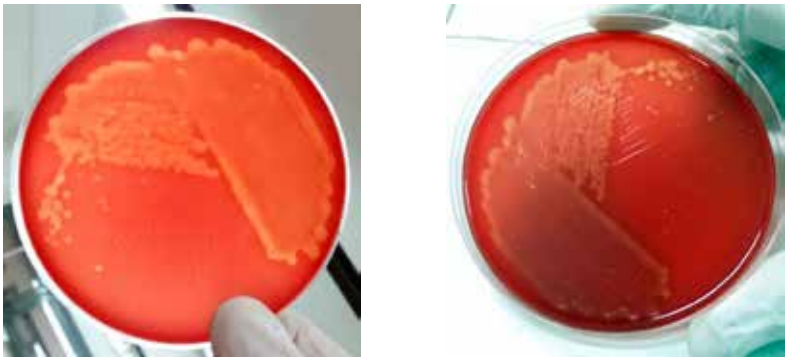


Figura 1. A y B. Cultivo puro de *Streptococcus agalactiae* en placas de agar sangre ovina al 5%. Obsérvese la beta-hemólisis alrededor de las colonias.

Una vez realizadas estas siembras, se continúa con las pruebas, tanto bioquímicas como serología confirmatoria de grupo, para identificación de SGB, de acuerdo al esquema propuesto. Para recordar el fundamento de las pruebas bioquímicas consultar los manuales de microbiología.

> Confirmación serológica de grupo

Se realiza a toda cepa recuperada utilizando técnicas de látex o co-aglutinación, que detectan el antígeno de la pared celular específico de grupo que caracteriza a SGB (el polisacárido ramnosa-glucosamina).

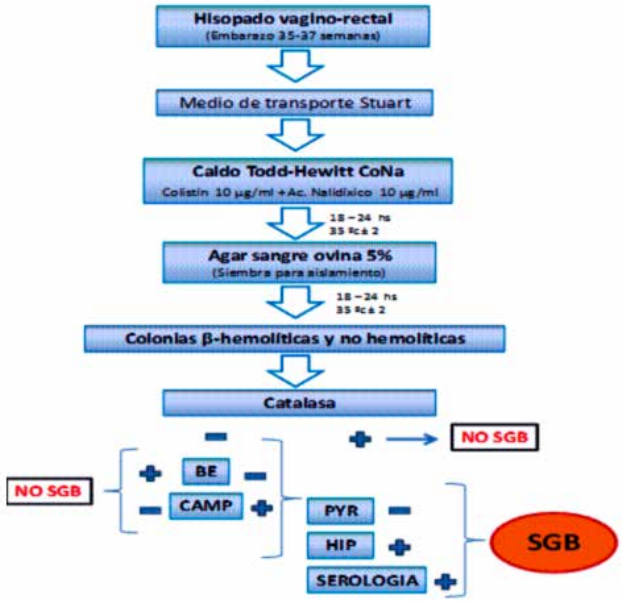
En nuestra experiencia se utilizó kit comercial para aglutinación con partículas de látex (Phadebact Strep B Test- ETC internacional-Bactus AB, Suiza). Debe cumplirse con la metodología propuesta por el fabricante.

Cuando en una placa de vidrio o cartón pintado de fondo opaco y oscuro, se pone en contacto el antígeno con los anticuerpos correspondientes, se produce una aglutinación marcada, fácilmente visible y detectada para cepas de SGB. Esta aglutinación a simple vista, se interpreta como prueba positiva.

La etapa diagnóstica de un laboratorio de bacteriología clínica concluye con la identificación correcta de SGB y la determinación de la sensibilidad a antimicrobianos macrólidos (Eritromicina y Clindamicina), en pacientes alérgicas a los beta-lactámicos.

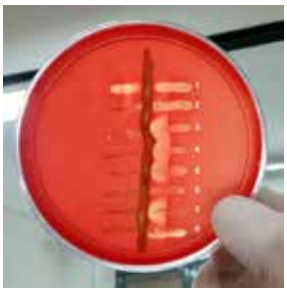
Las técnicas para evaluar sensibilidad a antimicrobianos se detallan en el **Capítulo 9.**

A los fines epidemiológicos, de investigación, se continúa con la clasificación de SGB en serotipos o serovares (habitualmente realizado en laboratorios de mayor complejidad o de referencia).

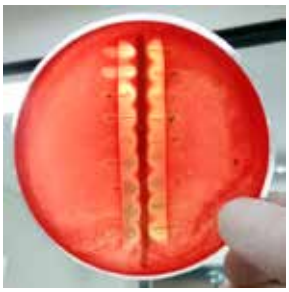


Flujograma 1. Algoritmo de aislamiento y tipificación de *Streptococcus agalactiae* (SGB).CoNa: Colistín-Nalidíxico; BE: Bilis Esculina; PYR: Pirrolidonilaminopeptidasa; HIP: Hidrólisis de hipurato; Serología: Prueba de aglutinación para confirmación de grupo con sueros Phadebact Strep B Test- ETC internacional-Bactus AB, Suiza.

Línea de siembra de
Staphylococcus aureus



Línea de siembra de
Staphylococcus aureus



A B

Figura 2. PRUEBA DE CAMP. A: Se observa en área a la derecha de la estría vertical de *Staphylococcus aureus*; PRUEBA DE CAMP POSITIVA, cepas N° 3, 4, 5 y 7; PRUEBA DE CAMP NEGATIVA, cepas 1,2 y 6. B: Se observan a ambos lados de la estría de *Staphylococcus aureus*, todas las cepas PRUEBA DE CAMP POSITIVA. Nótese claramente la punta de flecha observada por exacerbación de la zona de beta-hemólisis.

> Determinación de serotipo

La cápsula de SGB tiene una estructura polisacárida que posibilita la distinción actual de 10 serotipos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX). Para su clasificación se utilizan técnicas de aglutinación o métodos moleculares como Multiplex-PCR.

En las actividades de investigación que se desarrollan en la Cátedra, empleamos el test de aglutinación del Statens Serum Institut (Strep-B.Latex. Copenhague, Dinamarca), que contiene los 10 serotipos.

Con esta metodología detectamos por primera vez para Argentina, la presencia de SGB serotipo IX, con datos ya publicados.

> Caracterización molecular de SGB

Actualmente se realizan en la Cátedra de Bacteriología y en el Instituto de Biotecnología Misiones "Dra. Ebe Reca" (InBioMis), ambos dependientes de la Universidad Nacional de Misiones, actividades de investigación y posgrado que involucran técnicas moleculares para detección de mecanismos de resistencia a macrólidos y de factores de virulencia de SGB, con la finalidad de aportar al conocimiento de la sensibilidad y de la patogenia de este microorganismo.

> Caracterización molecular de la resistencia a macrólidos

Una vez detectado algún mecanismo de resistencia a macrólidos por métodos fenotipos (técnica de doble disco de Eritromicina y Clindamicina – D-test), realizamos la confirmación de la portación del gen reconocido para cada mecanismo por técnicas de PCR convencional.

Se estudian actualmente los siguientes genes:

- Gen *ermB*: Resistencia constitutiva a macrólidos (fenotipo $_{c}MLS_{B}$).
- Gen *ermTR*: Resistencia inducible a macrólidos (fenotipo $_{i}MLS_{B}$).
- Gen *mef*A: Mecanismo de eflujo (fenotipo M).
- Gen *lnu(B)*: Resistencia a Lincosamidas (Fenotipo L). Poco usual.

> Caracterización molecular de la virulencia

SGB cuenta con numerosos factores de virulencia, codificados por diferentes genes y expresados como proteínas de superficie en la célula bacteriana. Estas proteínas además pueden actuar como antígenos y generar respuesta inmune de memoria, por lo cual resultan ser candidatos posibles a incorporarse en el desarrollo de una vacuna materna protectora (actualmente en desarrollo).

Algunos de estos factores de virulencia se han descripto en este capítulo.

Para caracterizar la virulencia de SGB, hemos investigado la búsqueda de genes implicados en la codificación de proteínas de superficie que median diferentes etapas del camino al daño de SGB.

Adherencia y colonización: *bac*, *bca*, *rib*, *lmb*, *cspB* y *fbsA* (este último implicado especialmente a adherencia a epitelios del SNC y progresión a meningitis neonatal).

Invasión: *bca*, *rib*, *cspB*, *hylB*, *cylB*, *fbsA* y *fbsB*.
Injuria tisular: *rib, hylB*, *cspB* y *cylB*.
Diseminación: *rib, hylB*, *cylB*, *fbsA* y *fbsB*.
Evasión de la respuesta inmune del huésped: *bac*, *scpB* y *fbsA*.

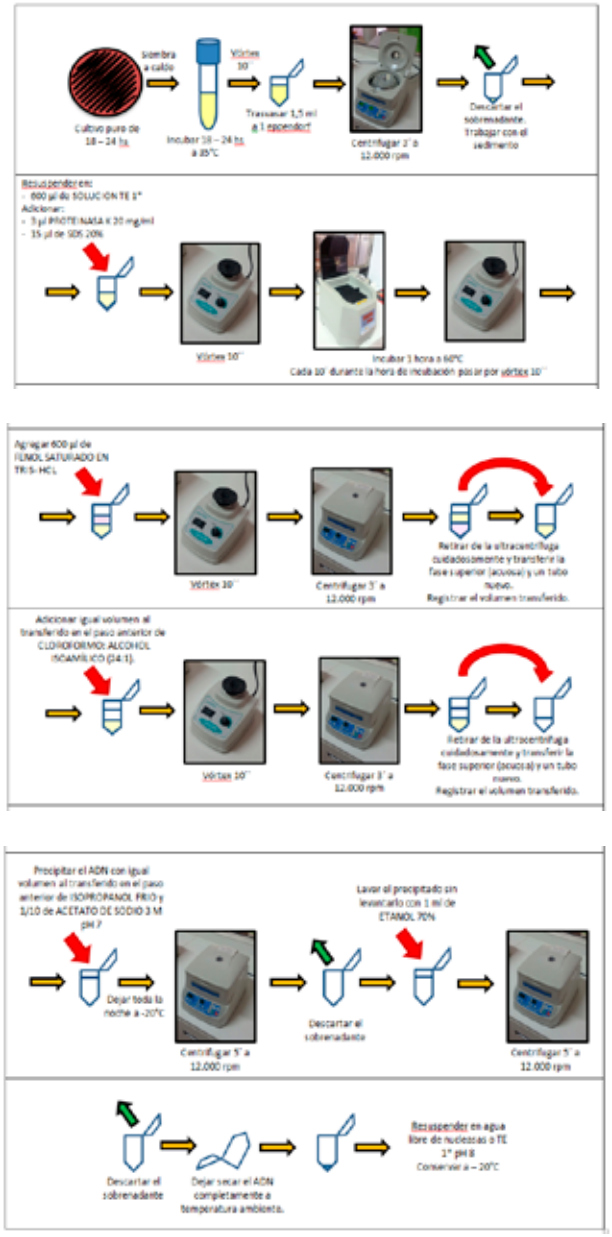
La investigación está centrada en la búsqueda de los genes mencionados en cepas invasivas de SGB con resultados muy satisfactorios.

Para realizar la extracción de ADN procariota se utiliza la técnica de Sambrook modificada por Cariaga y Zapata:

Técnica de Extracción de ADN

1. Partir de una placa con cultivo puro de SGB y en fase de crecimiento exponencial (18 – 24 hs).
2. Repicar a caldo Todd-Hewitt o caldo para estreptococos (Composición en g/l: Caldo Tripticasa Soya 30; Extracto de levadura 7,5; Sacarosa 5; Fosfato dipotásico 5. El medio es llevado a pH 7,4 y esterilizado en autoclave a 121ºC durante 15 minutos). Incubar a 35°C en estufa durante 18 – 24 hs.
3. Homogeneizar el cultivo en medio líquido y tomar 1,5 ml; centrifugar a 12.000 rpm, 3 minutos.
4. Resuspender el pellet en 600 ul de Solución TE 1 (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA).
5. Adicionar 3 ul de Proteinasa K 20 mg/ml. Vortear 10 segundos.
6. Adicionar 15 ul de SDS 20%, vortear 10 segundos e incubar durante 1 hora a 60 º C (agitar con vórtex cada 10 minutos).
7. Adicionar un volumen de Fenol saturado en Tris-HCl. Vortear 10 segundos.
8. Centrifugar 3 minutos a 12.000 rpm. Transferir la fase superior (acuosa) a un tubo nuevo.
9. Adicionar igual volumen de Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1). Vortear durante 10 segundos.

10. Centrifugar 3 minutos a 12.000 rpm. Transferir la fase superior (acuosa) a un tubo nuevo. NOTA: puede repetirse una vez más esta última extracción con Cloroformo: Alcohol Isoamílico.
11. Precipitar el ADN con un volumen de Isopropanol frío y 1/10 de Acetato de sodio 3 M pH 7. Dejar una noche a -20 º C.
12. Centrifugar durante 5 minutos a 12.000 rpm.
13. Extraer el Isopropanol y lavar el pellet con Etanol 70% sin levantar el precipitado.
14. Volver a centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos y extraer todo el alcohol con ayuda de una bomba y dejar secar a temperatura ambiente.
15. Resuspender en TE 1 pH 8 o bien en agua destilada estéril.
16. Conservar a -20 º C.



Esquema 1. Método de extracción de adn procariota.
*TE 1 (10 mM Tris-HCl Ph 8; 1 mM EDTA).

Preparación de soluciones para extracción de ADN:

Solución TE 1 (10 mM Tris-HCl Ph 8; 1 mM EDTA).

- Tris 1 Molar (M): 1 ml
- EDTA 0,5 M: 0,2 ml
- Agua destilada: c.s.p. 100 ml

Ajustar el pH a 8, esterilizar en autoclave a 1 atm; 121°C, por 15 minutos y preservar en heladera.

SDS 20%

Disolver 20 gramos (g) de SDS en 100 ml de agua destilada, esterilizar en autoclave a 1 atm, 121°C, por 15 minutos. Mantener a temperatura ambiente. Calentar en baño termostatizado si es necesario.

Fenol saturado en Tris-HCl

Fundir el fenol en baño termostatizado (temperatura de fusión: 80ºC). Una vez líquido, adicionar lentamente Tris-HCl pH 7.5 hasta saturar la solución. Permitir que se separen las 2 fases y ajustar con Tris 0.1 M hasta que el pH del Tris en equilibrio sea de 7.6. Almacenar en heladera en frasco color caramelo (se debe evitar la oxidación del fenol y siempre constatar el pH del mismo, no utilizándose si está oxidado o ácido).

Cloroformo: Alcohol isoamílico (24:1)

Mezclar 24 ml de cloroformo con 1 ml de alcohol isoamílico. Se pueden preparar volúmenes mayores respetando dicha proporción. Mantener a temperatura ambiente.

Acetato de Sodio 3 M pH 7

Pesar 246 g de acetato de sodio y disolverlo en 100 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7. Esterilizar en autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos y mantener en heladera.

Etanol 70%

- Etanol absoluto: 70 ml
- Agua destilada: c.s.p. 100ml

Proteinasa K 20 mg/ml

Comercialmente se distribuye en liofilizado o bien, en solución de glicerol. Preservar a -20ºC.

Evaluación cualitativa del ADN extraído

Para la evaluación cualitativa del ADN extraído se realizan corridas electroforéticas en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed®.

Las muestras se siembran en los pocillos del gel mezclando 3 µl de ADN genómico con 1 µl de buffer de siembra 6X, compuesto por Glicerol 60%; EDTA 0,01 M; Azul de bromofenol 0,1% y 1X de GelRed® (Biotium, 10000X). La corrida electroforética se realiza a 120 voltios por 25 min en una cuba SubSystem 70 modelo E 0310 (Labnet Internacional, Inc.) conectada a una fuente de poder Power

Station 300Plus (Labnet Internacional, Inc.). Las muestras se observaron bajo luz UV y las corridas fueron fotografiadas con cámara digital Canon Power Shot G10. El tampón utilizado en la cuba para realizar las corridas fue TBE al 0,5X.

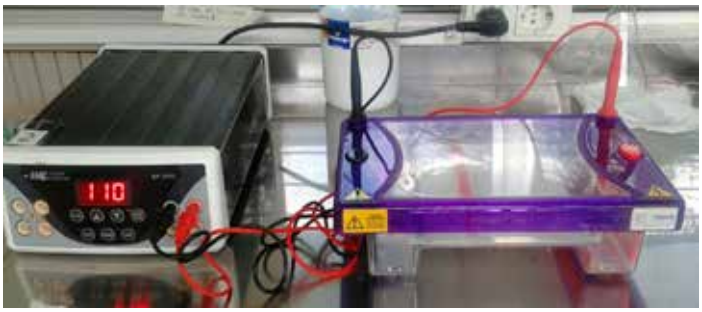


Figura 3. Cuba electroforética y fuente de poder utilizada para corrida de geles de agarosa. El gel se encuentra en el interior de la cuba, sumergido en buffer TBE 0,5X.

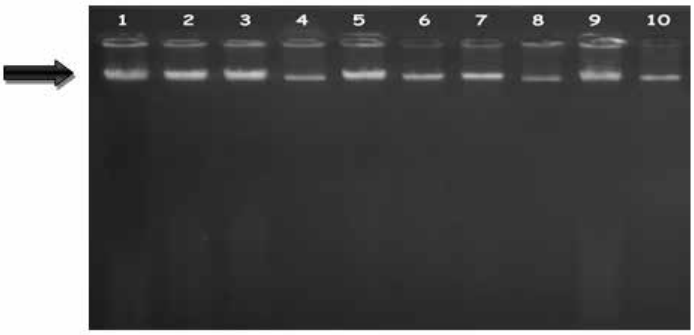


Figura 4. Resultado de la electroforesis en gel de Agarosa al 1% para verificación cualitativa de extracción de ADN en cepas de Streptococcus agalactiae.

Protocolo de la PCR

1. Cálculo de la Master Mix (Mezcla Maestra):

Para calcular la master mix debemos establecer el volumen final de la reacción en cada tubo de PCR. Cuando se realizan reacciones de PCR, se parte de una solución que contiene todos los elementos que requiere la polimerasa para sintetizar el ADN, excepto el ADN matriz, o sea el "blanco" de amplificación que se adiciona al final, una vez distribuida la master mix en cada uno de los tubos de reacción de PCR. Para esto se mezcla en un tubo

los siguientes componentes en las concentraciones indicadas, que son las concentraciones finales necesarias para la reacción:

- Buffer de la enzima taq polimerasa 1X
- $MgCl_2$ 2 mM
- dNTPs (desoxinucleótidos) 0,2 mM.
- cebadores 10 ppm de cada uno.
- Taq polimerasa 0,5 U.
- Agua destilada estéril libre de nucleasas hasta completar volumen

Luego de tener lista esta Master Mix, se reparte la misma en los tubos para PCR debidamente rotulados, se agrega el ADN matriz y se lleva al termociclador.

Para una concentración de $MgCl_2$ de 2 mM, como la del ejemplo y un volumen final de reacción de 20 µl (19 µl de master mix y 1µl de muestra de ADN) se emplea por cada tubo:

- 2 µl de Buffer 10X
- 1,6 µl de $MgCl_2$ 25mM.
- 1,4 µl de solución madre de dNTPs.
- 1 µl de cada cebador o *"primer"* 10 ppm (2 µl).
- 0,1 µl de Taq polimerasa de 5.000 U.
- 11,9 µl de agua destilada estéril libre de nucleasas.

Multiplicar cada volumen por la cantidad de muestras más 2 (un control negativo y un volumen de margen para poder pipetear sin problemas).

2. Una vez dentro del termociclador, la PCR transcurre en ciclos.

Un ciclo consta de 2 pasos:

- Calentamiento inicial que desnaturaliza el ADN objetivo o blanco a 94, durante 30 segundos.En el proceso de desnaturalización, las dos cadenas de ADN se separan una de la otra y permiten que la matriz se encuentre como cadena simple, paso necesario para las actividades llevadas a cabo por la polimerasa termoestable durante los pasos de amplificación.
- Reducción de la temperatura a un valor de 50 º C. A esta temperatura, cada uno de los oligonucleótidos (cebadores o *"primers"*) hibridan con la secuencia complementaria en cada una de las cadenas simples de ADN, que se han separado en el paso anterior, y sirven como ceba-

dores para la síntesis, utilizando una polimerasa termoestable. Ocurre durante 60 segundos.

- La síntesis de ADN o elongación se inicia cuando la temperatura de la reacción llega al valor óptimo para la actividad de la polimerasa. Para la mayoría de las polimerasas esta temperatura se encuentra en aproximadamente los 72 º C durante 60 segundos. Luego hay una elongación final donde se permite la síntesis durante 2 minutos. Este paso completa un ciclo, y el siguiente ciclo se inicia con el retorno de la temperatura a los 94 para una nueva desnaturalización.

Tabla 1. Secuencia de cebadores utilizados en PCR para amplificar genes de virulencia en cepas de *Streptococcus agalactiae*.

Genes	Sentido 5´- 3´	Antisentido 5´ - 3´	Amplicón (pb)	TM	Nº GenBank
bac	TGTAAAGGACGATAGTGTGAAGAC	CATTTGTGATTCCCTTTTGC	530	50	AB221536.1
bca	CAGGAAGGGGAAACAACAGTAC	GTATCCTTTGATCCATCTGGATACG	535	50	M97256.1
rib	CAGGAAGTGCTGTTACGTTAAAC	CGTCCCATTTAGGGTCTTCC	369	50	U58333.1
hylB	TTATCATCCAGCGCCTCCTAG	GTGGTGATAACTGACTTCTTGGGA	245	50	Y15903.1
lmb	GACGCAACACACGGCAT	TGATAGAGCACTTCCAAATTTG	300	50	AF062533.1
cspB	AGCCATATGCTGCGATCTCT	GGGTTGAACCAAGTGTGCTT	198	58	U56908.1
cylB	GGGCTGCAGGTATTATCGAA	ATTTCCACCAAAAGCAAACG	176	58	AF093787.2
fbsA	TGTAGCTAATGGACCGATGTT	TTTTCATTGCGTCTCAAACC	156	58	AJ437619.1
fbsB	ACAACTGCGGAAATGACCTC	ACGAGCGACGTTGAATTCTT	186	58	HQ267707.1

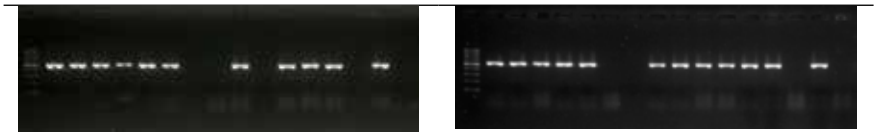
Tabla 2. Secuencia de cebadores utilizados en PCR para amplificar genes de resistencia en cepas de *Streptococcus agalactiae*.

Genes	Sentido 5´- 3´	Antisentido 5´ - 3´	Amplicón (pb)	TM	Nº GenBank
ermB	GAAAAAGTACTCAACCAAATA	AGTAATGGTACTTAAATTGTTTAC	639	50	DQ355148.1
ermTR	TTGGGTCAGGAAAAGGA	GGGTGAAAATATGCTCG	385	50	AF00216.1
mefA	GGTATCTTTAATCACTAGTGC	TTCTTCTGGTACTAAAAG	373	50	DQ445272.1

Figura 5. Termociclador utilizado para la reacción de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Visualización de productos de PCR.

Los productos obtenidos luego de la técnica de PCR se visualizan en gel de agarosa al 2% teñidos con GelRed®.



A B

Figura 6. Genes de virulencia. Electroforesis en gel de agarosa al 2% para los genes: A. Gen *bac*, B. Gen *bca*. Primera calle, marcador de peso molecular; calles 2 – 16, cepas de *Streptococcus agalactiae*; calle 17, control negativo.

Listeria monocytogenes

Son bacilos grampositivos pequeños, aerobios o anaerobios facultativos, móviles entre 10 y 25°C, no esporulados, no capsulados, catalasa positiva y productores de una pequeña zona de hemólisis en agar sangre.

La pruebas serológicas son de escaso valor en el diagnóstico debido a que *Listeria* comparte epitopes antigénicos con otras bacterias y produce reacciones cruzadas.

El diagnóstico bacteriológico de certeza de la infección perinatal, se realiza por aislamiento e identificación del microorganismo de muestras tomadas del neonato.

Se envían generalmente al laboratorio muestras de hemocultivos y LCR.

En el último consenso consultado de infecciones perinatales del año 2011, la Sociedad Argentina de Pediatría, sugiere además como posibles muestras para la búsqueda de *L. monocytogenes*: meconio, aspirado gástrico, placenta, líquido amniótico u otros sitios infectados.

La placenta se envía a anatomía patológica para la búsqueda de microabscesos y bacilos grampositivos en granulomas placentarios.

Hemocultivos

La muestra debe tomarse antes de comenzar el tratamiento antibiótico, excepto que la clínica y el compromiso del paciente no lo permitan.

Se recomienda tomar dos muestras de sangre de sitios diferentes, con por lo menos 30 minutos de diferencia entre cada toma.

Si se sospecha de bacteriemia intermitente (abscesos, artritis, osteomielitis) se pueden obtener tres muestras cada 24 hs.

De manera convencional, los hemocultivos se procesan según la metodología indicada en el **Capítulo 6**. Si se sospecha de *L. monocytogenes*, el primer subcultivo ciego a las 24 hs debe sembrarse además en agar sangre. Actualmente pueden utilizarse medios cromogénicos.

La presencia de bacilos grampositivos pequeños o cocobacilos cortos, observados al microscopio y el desarrollo de colonias pequeñas blanco grisáceas beta-hemolíticas en los subcultivos, es sospechoso de desarrollo de *L. monocytogenes*.

En los primocultivos *L. monocytogenes* suele no producir beta-hemólisis.

Las colonias sospechosas se siembran inicialmente para su identificación en agar bilis esculina, prueba de CAMP y SIM a temperatura ambiente.

La identificación presuntiva de *L. monocytogenes* se llega en aquellas cepas que resultan catalasa, bilis esculina, CAMP y movilidad positi-

vas. Estas cepas deben confirmarse con pruebas bioquímicas que permiten la diferenciación inicial de este microorganismo de otros géneros y dentro del mismo género de especies deferentes.

Tabla 1. Pruebas bioquímicas diferenciales de *Listeria monocitógenes* y géneros relacionados.

	Listeria	*Lactobacillus*	*Erisypelothrix*	*Enterococos*
Microscopía	cocobacilar	bacilar	bacilar	Cocos
Catalasa	+	-	-	-
Vancomicina	Sensible	Resistente	Resistente	Sensible/ Resistente
Movilidad	+	-	-	-/+
Producción SH2	-	-	+	-
Bilis Esculina	+	-	-	+
NaCl 6,5%	+	-	-	+
Beta-hemólisis	Variable	-	-	Variable

Adaptado de Callejo R et al. Manual de Procedimientos. Aislamiento, identificación y Caracterización de Listeria monocitogenes. Ministerio de Salud de la Nación. INEI. OMS. PAHO. 2008.

Existen además diferentes sistemas comerciales para la identificación de especies de *Listeria* como el API Coryne® (BioMérieux, Marcy I´Etoile, Francia) y RapID CB - Plus® (Remel, Lenexa, KS) tienen especies de *Listeria* y por lo menos identifican confiablemente el género de estas bacterias.

Determinación de serovariedades

> Serotipificación con antisueros

Las cepas aisladas y confirmadas por pruebas bioquímicas convencionales pueden ser serotipificadas con antisueros específicos.

Existen hasta el momento 13 serovariedades de *L. monocytogenes*, clasificados en base a los antígenos somáticos (O) y flagelares (H); 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7. Sólo tres de ellas (1/2a, 1/2b y 4b), han sido aisladas en más del 90% de los casos humanos y animales.

> Técnicas moleculares

Se han diseñado métodos moleculares para la identificación de *Listeria*. También existen pruebas con sonda quimioluminiscente de ADN altamente sensibles y específicas (AccuProbe® *Listeria* – Gen-Probe, San Diego, USA) y técnicas con sonda espectrofotométrica de ADN (GeneTrak Systems, Framingham MA), que permiten identificar el microorganismo aislado de cultivo primario.

Pueden emplearse técnicas de Multiplex – PCR diseñadas para determinar los diferentes serotipos de *L. monocytogenes*.

Generalmente la determinación de serovariedades, cualquiera sea el método empleado y la implementación de técnicas de biología molecular para la identificación, está reservada a laboratorios de referencia.

> Líquido cefalorraquídeo

Ante la sospecha de infección por *L. monocytogenes*, las muestras de LCR se procesan según la metodología descripta en el **Capítulo 6**.

La siembra se realiza además en placa de agar sangre oveja para visualizar beta-hemólisis. Luego continuar con las pruebas bioquímicas enunciadas para hemocultivos en este capítulo y esquematizadas en la figura siguiente.

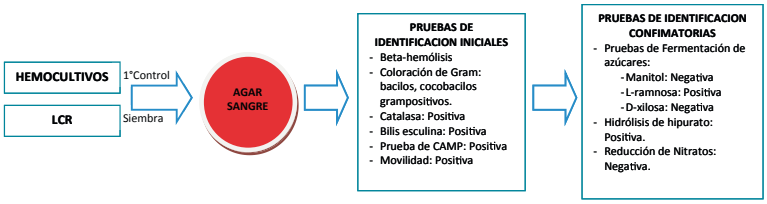


Figura 1. Esquema de identificación de *Listeria monocytogenes* por técnicas microbiológicas convencionales.

Sífilis congénita (*T. pallidum*)

El diagnóstico de certeza se realiza con la visualización de *T. pallidum*, que puede detectarse en las lesiones habitadas de las zonas infectadas, mediante el microscopio de campo oscuro o pruebas de inmunofluorescencia directa del material de la lesión.

La baja sensibilidad de estas técnicas hace que el diagnóstico se base en estudios serológicos.

> Cultivo y aislamiento

El *T. pallidum* no se cultiva *"in vitro"*; la única manera de lograr su desarrollo en el laboratorio, es la inoculación en células epiteliales de conejo, método costoso y poco práctico.

En conclusión el laboratorio de microbiología desempeña un rol limitado en el diagnóstico de sífilis congénita, excepto que cuente con metodologías que permitan la identificación del microorganismo por microscopía.

Los métodos más utilizados para el diagnóstico de sífilis congénita son métodos serológicos indirectos (detectan anticuerpos). Estas pruebas se realizan en muestras de suero o plasma obtenidos de sangre periférica o LCR.

> Pruebas serológicas

Son las más difundidas y utilizadas. Utilizan antígenos treponémicos y no treponémicos. Detectan tanto anticuerpos IgG como IgM.

Cuando se trata de anticuerpos de tipo IgG, resulta difícil distinguir si son transferidos por vía placentaria por la madre y si son producidos por el neonato en respuesta a la infección.

Si una madre infectada con *T. pallidum*, transfiere al niño anticuerpos producidos durante la infección (IgG), los títulos de estos anticuerpos serán iguales o menores a los de la madre.

Títulos de anticuerpos cuatro veces mayores a los de la madre en el niño, son sugestivos de infección neonatal, aunque excepcionalmente el recién nacido puede tener títulos más bajos que su madre o incluso pruebas serológicas negativas.

Se llega fácilmente al diagnóstico de sífilis congénita en recién nacidos con pruebas no treponémicas positivas y síntomas de la enfermedad.

Un desafío diagnóstico lo constituyen los recién nacidos asintomáticos de madres con test serológico positivo cercanos al nacimiento, sin datos de duración de la enfermedad y de tratamiento efectuado.

> Pruebas no treponémicas

VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) y RPR (Rapid Plasma Reagin). Detectan anticuerpos anticardiolipina. Ante un resultado positivo se debe cuantificar.

Presentan falsos negativos en la infección perinatal reciente y ante un exceso de complejos antígeno anticuerpo (fenómeno de prozona).

Presentan falsos positivos en colagenopatías, enfermedades autoinmunes, TBC, mononucleosis, endocarditis. Los falsos positivos se presentan en general a bajo título de anticuerpos.

Estas pruebas son útiles para el diagnóstico y seguimiento postratamiento.

Toda prueba no treponémica positiva debe confirmarse por pruebas treponémicas.

> Pruebas treponémicas

Detectan anticuerpos específicos contra el *T. pallidum*.

Son altamente sensibles y se mantienen reactivas en un alto porcentaje de pacientes, luego del tratamiento antibiótico. Las técnicas más utilizadas son: FTA-Abs (inmunofluorescencia) y TPHA (hemaglutinación). Falsos positivos se observan en otras enfermedades por espiroquetas: leptospirosis, enfermedad de Lyme, fiebre por mordedura de ratas, frambesia y pinta.

> Otras técnicas

ELISA: Presenta alta sensibilidad y especificidad por medio de la purificación de proteínas específicas del *T. pallidum*.

IgM FTAAbs 19S: Utiliza una IgM de 19S obtenida por ultracentrifugación y por lo tanto de mayor especificidad. Esta IgM permanece poco tiempo después del tratamiento y su reaparición significa reinfección. Es de gran utilidad en los siguientes casos: sífilis temprana, determinar éxito terapéutico y diagnosticar una reinfección.

Western-blot: Actualmente está siendo evaluada y permite la detección de anticuerpos IgM contra un antígeno de 47 kDa.

Cualquiera de las técnicas mencionadas anteriormente para dosaje de anticuerpos de tipo IgM específicos presenta alrededor de un 20 – 40% de falsos negativos.

> Diagnóstico en líquido cefalorraquídeo

Resulta difícil la evaluación del compromiso del SNC. Se ha demostrado la presencia de *T. pallidum* en LCR y ausencia de alteraciones bioquímicas con reactividad de las pruebas serológicas utilizadas.

Se confirmó también el pasaje pasivo de anticuerpos de tipo IgG maternos a través de la barrera hematoencefálica generando una interpretación errónea de las pruebas serológicas en el niño.

La VDRL es la única prueba no treponémica recomendada para el diagnóstico de neurosífilis.

Una VDRL positiva es altamente específica de neurosífilis pero poco sensible.

La sensibilidad aumenta si se consideran además de la VDRL en LCR, las características del citoquímico (células y proteínas) y las condiciones del paciente.

Un paciente con prueba de VDRL negativa, citoquímico normal y asintomático, tiene una probabilidad menor al 5% de estar cursando una neurosífilis.

Se recomienda la realización de pruebas no treponémicas en LCR en las siguientes situaciones:

- Sífilis congénita con manifestaciones clínicas, títulos no treponémicos más de 4 veces los maternos.
- Sífilis congénita con diagnóstico posterior al período neonatal.
- Sífilis con más de un año de evolución.
- Pacientes VIH positivos.
- Cuando no se observe una disminución en los títulos de VDRL.
- Cuando hayan recibido tratamiento previo no penicilínico.

> Otras pruebas utilizadas en el diagnóstico de neurosífilis:

- FTA – Abs en LCR: Sólo tiene valor si es negativa para descartar neurosífilis. Es poco específica por lo que puede dar falsos positivos, por lo tanto los casos positivos no confirman neurosífilis.
- PCR en LCR: Limitada a centros de referencia. Su sensibilidad disminuye en recién nacidos con sífilis congénita asintomáticos. Un resultado negativo no descarta neurosífilis.

Mycoplasma genitales

Para el diagnóstico de infección perinatal se prioriza actualmente el uso de técnicas serológicas y de detección rápida de antígenos de micoplasmas genitales, especialmente con anticuerpos monoclonales.

La razón del uso de estas técnicas, se explica por las características de los mycoplasmas. Son bacterias muy exigentes, su metabolismo es fermentativo, con características inusuales en otros microorganismos, relacionadas con sus necesidades nutricionales (algunos requieren colesterol y urea para su desarrollo). Además, al carecer de pared celular necesitan condiciones de osmolaridad y pH bien definidas que afectan su labilidad.

Las dificultades existentes, hasta hace unos años, para el aislamiento y la identificación de los micoplasmas en cultivo, su baja recuperación, el tiempo requerido para su desarrollo e identificación definitiva, la necesidad de profesionales especializados y los costos elevados, son elementos que condicionan la búsqueda por métodos de diagnóstico bacteriológico convencional.

Los condicionantes mencionados, sumado al hecho de que muchas veces las muestras clínicas tienen un bajo inóculo, como ocurre en los recién nacidos, donde existe la necesidad de establecer un diagnóstico etiológico rápido, en los casos de neumonía atípica o de neuroinfección perinatal de comportamiento aséptico, hacen que se utilicen otras técnicas para el diagnóstico microbiológico que son alternativas a los cultivos.

Actualmente existen técnicas basadas en el metabolismo microbiano, pruebas de biología molecular, ensayos bioenzimáticos y métodos serológicos.

Las técnicas disponibles, permiten detectar la presencia de *Ureaplasma* spp. en el tracto respiratorio inferior de niños de bajo peso al nacer, asociada a neumonía congénita, enfermedad pulmonar crónica y en ocasio-

nes muerte fetal. Existe cada vez más relación entre ureaplasma y displasia broncopulmonar del neonato pretérmino.

Ureaplasma spp. también puede ser identificado en sangre y LCR, siendo la infección sistémica menos frecuente que la colonización respiratoria y la displasia broncopulmonar.

Existen diferencias claras entre el diagnóstico de infección genitourinaria por micoplasmas, para la cual, se encuentran disponibles actualmente técnicas de cultivo y se prioriza su utilización junto técnicas de biología molecular dejando en segundo plano su diagnóstico por técnicas serológicas por la complejidad de interpretar los títulos de anticuerpos que permita detectar colonización o infección.

En las infecciones perinatales descriptas, las técnicas serológicas determinan el éxito diagnóstico por su sencillez y rapidez.

La dificultad de aislar micoplasmas de muestras respiratorias ha sido el principal factor para que el diagnóstico de la neumonía causada por esta bacteria se enfoque a través de técnicas serológicas.

La presencia de IgM en población infantil indica, generalmente infección aguda. Aunque puede permanecer elevada durante meses e incluso años, la IgM no puede atravesar placenta por lo que indica infección en el niño.

Se han utilizado a lo largo de los años diferentes técnicas: Crioaglutininas, fijación de complemento, aglutinación de partículas sensibilizadas, enzimoinmunoanálisis (EIA) para detección de anticuerpos tanto IgG como de tipo IgM.

Existen también, técnicas rápidas para la detección de antígenos, Algunas de estas técnicas son: inmunofluorescencia directa, contrainmunoelectroforesis, inmunoblot y enzimoinmunoensayo (Ag-EIA) de captura de antígeno.

La metodología más utilizada actualmente se basa en la detección de anticuerpos monoclonales. Una de las técnicas empleada, por ejemplo, para la detección de *M. hominis*, usa técnicas de inmunofluorescencia (IF) y ELISA, utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína antigénica p120 de este microorganismo.

La inmunofluorescencia indirecta para *Mycoplasma genitalium* también resulta sensible y específica.

Técnicas de biología molecular que utilizan las bases de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se encuentran cada más difundidas como técnicas diagnósticas, aunque se encuentran generalmente reservadas a la-

boratorios de referencia y no diferencian la colonización asintomática de la infección.

Bibliografía consultada

Acosta Boga B, Codina Grau M, Matas Andreu L, Meseguer Peinado M. Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones por Mycoplasma spp y Ureplasma spp. Procedimientos en Microbiología Clínica. SEIMC. 2011.

Al Safadi R, Amor S, Hery-Arnaud G, Spellerberg B, Lanotte P, Mereghetti L, et al. Enhanced expression of lmb gene encoding laminin-binding protein in Streptococcus agalactiae strains harboring IS1548 in scpB-lmb intergenic region. *PLoS One*. 2010; 5(5): e10794. doi:10.1371/journal.pone.0010794.

Aznar Martín J, Blanco Galán MA, Lepe Jiménez J, Otero Guerra L, Vázquez Váldes F. Diagnóstico Microbiológico de la Infecciones de Transmisión Sexual y Otras Infecciones Genitales. Procedimientos en Microbiología Clínica. SEIMC. 2007.

Ariel Cisternas V. , Dr. Nestor Lagos N. , Jennifer Galstuch L. , Carolina González R. , Dr. Claudio García C. , Joselyn Díaz T. Infección por Listeria monocytogenes y embarazo con buen resultado perinatal. *REV CHIL OBSTET GINECOL* 2002; 67(3): 237-241

Brooks G, Butel J, Ornston N. Micoplasmas y bacterias con pared celular defectuosa. En: Jawetz E, Melnick J, Adelberg E, editores. *Microbiología médica*. 14 ed. La Habana: ECIMED; 2008: pp 285-7.

Callejo M, Prieto M, Martínez C, Aguerre L, Rocca F, Martínez G. *Manual de Procedimientos. Aislamiento, identificación y caracterización de Listeria monocytogenes.* Ministerio de Salud de la Nación. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas "Dr Carlos G. Malbrán". OMS-PAHO. 2008.

Cariaga Martinez AE, Zapata PD. *Protocolos de extracción de ADN. El laboratorio de biología molecular*. Edición ampliada. Posadas: EdUNaM. 2007. Pp. 23-39.

Cassell GH, Waites KB, Watson HL, Crouse DT, Harasawa R. Ureaplasma urealyticum intrauterine infection: role in prematurity and disease in newborns. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6(1): 69-87.

CDC-Centers for Disease Control and Prevention: Prevention of perinatal group B: revised guidelines from CDC. MMWR Recomm Rep. 2010; 59 (RR-10): 1-31.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. M100–S21. Vol. 31 Nº 1. 2011.

Centro Latinoamericano de Perinatología/Salud de la Mujer y Reproductiva-CLAP/SMR. Organización Panamericana de la Salud–OPS/OMS. Infecciones Perinatales. Transmitidas por la Madre a su Hijo. Montevideo, Uruguay. 2008.

Chen VL, Avci FY, Kasper DL. A maternal vaccine against group B Streptococcus: past, present, and future. Vaccine. 2013; 31(4): D13-D19. doi:10.1016/j.vaccine. 2012. 12. 080.

Committee on Obstetric Practice, American College of Obstetricians and Gynecologists. Committee Opinion No. 614: Management of pregnant women with presumptive exposure to Listeria monocytogenes. Obstet Gynecol. (2014)124(6): 1241-4. doi:10.1097/01.AOG.0000457501.73326.6c.

Dalmarco Eduardo M, Blatt Solange L, de Cordoví Caio MM. Assessing the rate of isolation of mycoplasma treatment of urogenital by a business method in compared with media culture produced in itself laboratory. *Rev Bras Anal Clin*. 2008; 40(2): 151-3.

De Francesco MA, Caracciolo S, Gargiulo F, Manca N. Phenotypes, genotypes, serotypes and molecular epidemiology of erythromycin-resistant Streptococcus agalactiae in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, Vol. 2012; 31(8): 1741-7. doi:10.1007/s10096-011-1495-4.

Deschutter EJ. Incidencia y Distribución de la Sífilis Congénita en Misiones (Argentina). EdUNaM. 2011.

Dutra VG, Alves VM, Olendzki AN, Dias CA, de Bastos AF, Santos GO, et al. Streptococcus agalactiae in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. BMC Infect Dis. 2014; 14(1): 323-330. doi:10.1186/1471-2334-14-323.

Gutiérrez-Barquín I, Barber Marrero M, Cabrera Morales F, Valle Morales L, García Hernández J. Infección Perinatal por Listeria monocytogenes durante el embarazo y el parto. *Prog Obstet Ginecol*. 2007; 50(8): 457-66.

Jensen JS, Borre MB, Dohn B. Detection of Mycoplasma genitalium by PCR amplification of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(1): 261-6.

Keil A , Laczeski M, Oviedo P,Pegels E, Quiroga M, Fonseca M, Vergara M. Detección del gen rib en Streptococcus agalactiae 2011. *Rev. Cienc. Tecnol*. UNAM – Vol14

Koneman EW, Winn WC (h.), Allen SD, Janda WM, Procop GW, Schreckenberg PC. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas en color. 6th Edición. Ed. Médica Panamericana. 2008.

Laczeski ME, Pegels ER, Oviedo PN, Quiroga MI, Vergara MI. Streptococcus agalactiae: medios de conservación accesibles a laboratorios de diagnóstico de baja y mediana complejidad. *Rev Cubana Hig y Epidemiol*. 2013; 51(2): 129 – 139.

Laczeski M, Pegels E, Oviedo P, Quiroga M, Vergara M. Primer Estudio en Misiones de Genes de Resistencia a Macrólidos en Streptococcus agalactiae. *Rev Cienc Tecnol*. 2013; 20: 66 – 72.

Laczeski M, Pegels E, Oviedo P, Quiroga M, Vergara M. Molecular profiles and antimicrobial susceptibility of first isolates of Streptococcus agalactiae serotype IX in Argentina. *Adv in Microbiol*. 2014; 4(1): 317 – 323.

Laguna-Del Estal P, Lledó-Ibáñez GM, Ríos-Garcés R, Pintos-Pascual I. Meningitis por Listeria monocytogenes en adultos. *Rev Neurol* 2013; 56: 13-8.

Ley 26369. Control y prevención de embarazadas respecto del examen de detección del estreptococo grupo B (Streptococcus agalactiae), publicada en Boletín Oficial 7-5-2008.

Martins ER, Andreu A, Correia P, Juncosa T, Bosch J, Ramirez M, et al. Group B streptococci causing neonatal infections in barcelona are a stable clonal population: 18-year surveillance. *J Clin Microbiol*. 2011; 49(8): 2911-2918. doi:10.1128/JCM. 00271-11.

Ministerio de Salud de la Nación. *Sífilis Congénita*. Informe Técnico. Área de Epidemiología. Región Sanitaria II. Buenos Aires, Argentina. 2013.

Nailet Arráiz R, Colina S, Rafael Marcuzzi J, Rondón N, Francia Reyes S, Valmore Bermudez P, et al. Detección de Micoplasma genitalium y correlación con manifestaciones clínicas en una población del estado Zulia. Venezuela. *Rev Chil Infect.* 2008; 25(4): 256-61.

Oakeshott P, Hay P, Taylor-Robinson D, Hay S, Dohn B, Kerry S, Jensen JS. Prevalence of Mycoplasma genitalium in early pregnancy and

relationship between its presence and pregnancy outcome. BJOG. 2004; 111(12): 1464-7.

Ory Manchón F, García Campero A, Fuertes Ortiz de Urbina A, García Bermejo I, Sierra Soler M. Estudios serológicos en la prevención de la infección congénita prenatal. Procedimientos en Microbiología Clínica. *SEIMC*. 2004.

Oteo J, Alós J I. *Listeria y LISTERIOSIS*. Servicio de Microbiología. Hospital de Móstoles. Madrid. Control Calidad SEIMC. 2013 http: // www. seimc. org/control/revi_Bacte/listeria. htm

Oviedo P, Pegels E, Laczeski M, Quiroga M, Vergara M. Phenotypic and genotypic characterization of Streptococcus agalactiae in pregnant women. First study in a province of Argentina. *Braz J Microbiol*. 2013; 44(1): 253-258.

Palmiere C, Vanhaebost J, Ventura F, Bonsignore A, Bonetti LR. Cerebrospinal fluid PCR analysis and biochemistry in bodies with severe decomposition. *J Forensic Leg Med*. 2015; 30: 21-4. doi:10.1016/j.jflm. 2014. 12. 012.

Patricia Oviedo, Eduardo Pegels, Marina Quiroga, Vergara M. La resistencia a eritromicina y clindamicina de en mujeres embarazadas en la provincia de Misiones. 2010. *La Gaceta Inf Mic*; 4(4): 15.

Patterson MJ, Davies HD. Syphilis (Treponema pallidum) In_ Kliegman RM, Behman RE, Jenson HB, stanton BF, eds. Nelson Textbook og Pediatricd 19th ed. Philadelphia, Pa. Saunders Elsevier: 2011: chap: 210

Paz Burgos, Lidia Emma . Treponema pallidum: estructura y antigenicidad. 2010. Revisiones bibliográficas Univ. Cienc. Soc. v. 1 n. 2

Pegels E., Quiroga M. , Oviedo P. , Pereyra E. , Galloso P. , Vergara M: Caracterización fenotípica de resistencia a macrólidos en Steptococcus agalactiae: primer estudio en misiones. *Rev. Cienc. Tecnol*. Año 10 / Nº 10a / 2008 / 8–11.

PICTO (Proyectos de Investigación Científica y Tecnológica Orientados) 2006- 2008

Estudio de Infecciones Bacterianas Perinatológicas en Provincia de Misiones. Directora: Vergara M. Cátedra de Bacteriología – Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones. Código 36831.

Proyecto de Investigación "Estudio de Infecciones Bacterianas Perinatológicas en Posadas, Misiones". 2004-2006. Directora:

Vergara M. Cátedra de Bacteriología – Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones. Código 16Q266.

Primer Consenso de Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de las Enfermedades de Transmisión Sexual. 2011.

Quiroga M, Álvarez O, Pegels E, Oviedo P, Pereyra E, Vergara M. Estudio comparativo de dos medios selectivos para la recuperación de Streptococcus agalactiae en embarazadas. *Revista de Ciencia y Tecnología*. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones.

Quiroga M, Pegels E, Oviedo P, Pereyra E, Vergara M. Antibiotic susceptibility patterns and prevalence of group B Streptococcus isolated from pregnant women in Misiones, Argentina. *Braz J Microbiol* 39: 245-250. 2008.

R. Garza-Velasco y cols: *La sífilis y los principales factores de virulencia de Treponema pallidum*. Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM, 2010.

Rivera-Tapia J, Cedillo-Ramírez M, Vega-Benítez, M. "Micoplasmas y su importancia Médica". *Rev Biomed*. 2001; 12: 262-271.

Ruvinsky R, Bruno M, Rial M. Consenso de Infecciones Perinatales. Sociedad Argentina de Pediatría. En: http://www.sap.org.ar/infecciones_perinatales_bacterianas. php. Consultado 7 de febrero de 2015.

Sambrook J, Rusell DW. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Sprong Harbor. Sambrook J, Rusell DW. Nueva York, 2001, Vols. 1-3.

Vergara M, Quiroga M, Pegels E, Oviedo P, Laczeski, M. *Guías para el Diagnóstico en Bacteriología Clínica*. Cátedra de Bacteriología. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Editorial Universitaria Misiones. 2009.

Vergara Marta y cols. *Las Infecciones Bacterianas y el Laboratorio de Bacteriología.* EdUNaM. 2009.

CAPÍTULO 9

Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos ■ marina quiroga

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las tareas más importantes de los laboratorios de microbiología clínica, siendo su principal objetivo el determinar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos.

Estos estudios definen la actividad *in vitro* de un antimicrobiano frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana.

La determinación de la sensibilidad está indicada en los casos en que el microorganismo causal de la infección pertenezca a una especie capaz de exhibir un comportamiento cuantificable frente a los antimicrobianos de uso clínico. Las pruebas de sensibilidad también son importantes en estudios epidemiológicos relacionados a la resistencia microbiana de diversos microorganismos.

Para aquellos microorganismos que poseen sensibilidad a antimicrobianos predecibles, se recomienda la aplicación de la terapia empírica adecuada.

Rara vez se realizan pruebas de sensibilidad para microorganismos sensibles a una droga altamente eficaz, (por ejemplo *S. pyogenes* que ha mantenido invariable su sensibilidad a penicilina). Sin embargo, las pruebas de sensibilidad pueden ser necesarias cuando aún, conociéndose la sensibilidad del microorganismo a drogas altamente efectivas, el paciente no puede recibir dicha medicación (por ejemplo: *S. pyogenes* en pacientes alérgicos a la penicilina, en este caso puede probarse su sensibilidad frente a eritromicina y otros macrólidos).

Para realizar pruebas de sensibilidad se debe partir de un cultivo primario de cada tipo de microorganismo, previamente tipificado y que pueda tener rol patógeno.

No se deben realizar pruebas de sensibilidad sobre mezclas de diferentes tipos de microorganismos, ni sobre el material clínico sin procesar, excepto para emergencias clínicas donde la coloración de Gram sugiera la presencia de un sólo patógeno.

Cuando la prueba de sensibilidad haya sido realizada a partir del material clínico, se debe informar como resultado preliminar el que deberá ser confirmado, o no, reiterando la prueba utilizando la metodología estandarizada.

No es aconsejable la realización de pruebas de sensibilidad, cuando no es clara la naturaleza de la infección y la muestra contiene una población bacteriana habitual o polimicrobiana, en la cual el o los microorganismos aislados probablemente tengan poca relación con el proceso infeccioso. En estos casos los resultados obtenidos pueden conducir a errores en el tratamiento.

Metodo de determinación de sensibilidad antimicrobiana por difusion con discos

En la mayoría de los laboratorios clínicos se utiliza el método de difusión en agar con discos, conocido generalmente como "Kirby-Bauer", para ensayar la susceptibilidad de microorganismos comunes de crecimiento rápido y de algunos microorganismos fastidiosos.

El principio del método involucra el uso de una cantidad constante de antimicrobianos en un reservorio. Para estudiar la sensibilidad de un microorganismo por técnicas de difusión se dispone de dos sistemas, el de discos de papel impregnados con el antimicrobiano y las tabletas, consistentes en una suspensión del antimicrobiano liofilizada y comprimida en material inerte, como las tabletas Neo-Sensitabs que miden 9 mm de diámetro y contienen dichos antimicrobianos cristalinos mezclados con un granulado para su protección.

Sea el soporte elegido del antimicrobiano, el mismo es aplicado sobre la superficie del agar en el cual se ha cultivado el microorganismo en cuestión. Tan pronto el disco o tableta, impregnado ya con la droga en estudio se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el antimicro-

biano difunde radialmente a través del espesor del agar formándose un gradiente de concentración.

La sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento alrededor del reservorio. El diámetro obtenido dependerá no solo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco o tableta, sino también del espesor de la capa del agar, su pH y composición, de la capacidad de difusión de la droga en ese medio, la temperatura, la velocidad de duplicación bacteriana, y el tamaño y fase de crecimiento del inóculo.

La determinación de la sensibilidad de un microorganismo basada únicamente en la presencia o ausencia de un halo de inhibición no es aceptable. Para que los resultados sean confiables y repetibles los procedimientos deben ser controlados y estandarizados cuidadosamente y los halos de inhibición deben ser cuidadosamente medidos y comparados con tablas de interpretación que están respaldadas por datos clínicos y de laboratorio.

Para algunos microorganismos no se han desarrollado estándares reproducibles y definitivos para la interpretación de resultados. Estos microorganismos podrían requerir medios o atmósferas de incubación diferentes, o se ha observado marcada diferencia en el grado de crecimiento cepa a cepa. Para ellos, se recomienda consultar con un especialista en enfermedades infecciosas para determinar la necesidad de realizar la prueba de sensibilidad y la forma de interpretación de los resultados.

Los datos publicados en la literatura médica y las actuales recomendaciones o consensos para el tratamiento de microorganismos poco frecuentes podrían obviar la necesidad de realizar las pruebas de sensibilidad. En el caso que sea necesario, el método de dilución usualmente es el método más apropiado, en ese caso tal vez se requiera enviar el organismo a un centro de referencia. Los médicos deben ser informados de las limitaciones de los resultados y advertidos de que deben interpretarlos con precaución.

Para evitar confusiones, todos los antimicrobianos que se utilizarán en las pruebas de susceptibilidad deberán ser referidos por su nombre genérico.

La selección de los agentes antimicrobianos apropiados para el método de difusión, es una decisión de cada laboratorio clínico en consulta con el cuerpo médico, el comité de farmacia y el comité de enfermedades infecciosas, teniendo en cuenta la eficacia clínica, prevalencia de resistencia, costo, indicaciones de concensos, para drogas de primera elección y alternativos.

Para evitar una errónea interpretación, el informe de rutina al médico, deberá incluir únicamente las drogas apropiadas al uso terapéutico. Otras drogas no indicadas en la terapéutica pueden ser ensayadas para proveer datos accesorios que ayuden a la investigación, identificación o detección de mecanismos de resistencia, debiendo quedar disponibles sólo para el laboratorio o para el comité de control de infecciones.

Para la realización de una adecuada prueba de sensibilidad, el número de antimicrobianos probados debe ser limitado. En general, deberá incluir sólo un representante de cada grupo de drogas relacionadas con mecanismo de acción semejante y para las cuales la interpretación podría ser la misma.

A1- Medio de cultivo

De los medios disponibles se considera al agar Mueller Hinton (M-H) el mejor para las pruebas de sensibilidad de rutina dado que muestra buena reproducibilidad lote a lote, contiene bajo nivel de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina, es adecuado para el desarrollo de la mayoría de las bacterias patógenas y existe abundante bibliografía que avala la experiencia de las pruebas de sensibilidad realizadas en este medio.

Aunque el M-H es generalmente confiable para las pruebas de sensibilidad, los resultados obtenidos con algunos lotes pueden, en ocasiones, variar significativamente. Si un lote de medio no sustenta el adecuado crecimiento de los microorganismos ensayados, o los halos de inhibición obtenidos en las pruebas por difusión quedan fuera de los límites de control de calidad, no debe ser utilizado ya que conducirá a resultados erróneos.

Solo bacterias aeróbicas o facultativas que crecen satisfactoriamente en agar M-H sin suplementar podrían ser testeadas en este medio. Los métodos estandarizados para microorganismos fastidiosos que requieren suplementar el M-H se describen en páginas 20 a 23.

El **pH** para cada lote debe ser controlado cuando se prepara el medio. El agar debe tener un pH 7,2 - 7,4 a temperatura ambiente y debe determinarse después de su solidificación. Si el pH es demasiado bajo, ciertas drogas (por ej. aminoglucósidos, quinolonas y macrólidos) parecerán menos activas; mientras que otras (por ej. tetraciclinas) parecerán tener mayor actividad. Si el pH es demasiado alto se podrían esperar los efectos opuestos.

Otro factor a tener en cuenta es el contenido de **timina o timidina** que presenta el medio. Los medios que contienen excesiva cantidad de timina o

timidina pueden revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y trimetoprima, produciendo zonas pequeñas, menos nítidas o sin halo pudiendo dar como resultado un informe de falsa resistencia. El agregado de timidina fosforilada o sangre lisada de caballo puede mejorar la nitidez de los halos y la confiabilidad de las pruebas para sulfonamidas y trimetoprima frente a patógenos comunes, excepto para enterococos. Para evaluar cada lote de M-H en su contenido de timidina se debe utilizar una cepa control *(Enterococcus faecalis* ATCC 29212 o ATCC 33186) que se prueba frente a discos de trimetoprima *I* sulfametoxazol. Un medio satisfactorio mostrará un halo de inhibición claro y definido de 20 mm o más.

También, la variación en **cationes divalentes principalmente Ca^{+2} y Mg^{+2}** afectan los resultados con tetraciclina, colistina y aminoglucósidos frente a *P. aeruginosa.* Un excesivo contenido de cationes reducirá la zona de inhibición, mientras que bajas concentraciones de cationes producirán el efecto opuesto. Un exceso de zinc podría reducir las zonas de inhibición de los carbapenemes.

Las pruebas realizadas con cada lote de M-H deben estar de acuerdo con los límites de control establecidos por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) utilizando cepas patrones y los resultados deben ser cuidadosamente observados a fin de detectar alteraciones en los valores de los halos debido a la composición de cationes del medio de cultivo.

Al preparar las placas existen una serie de factores a tener en cuenta. Luego de preparado el M-H a partir de la base deshidratada de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, e inmediatamente después de esterilizar, se recomienda enfriarlo en baño de agua hasta 45-50°C, a fin de que una vez que sea vertido en las placas no produzca la formación de abundante vapor de agua que podría provocar un exceso de humedad.

Al verter el medio en las placas de Petri se debe alcanzar un nivel aproximado de 4 mm de altura que corresponde aproximadamente a 20 ml para placas de 90 mm de diámetro. Placas muy "finas" (escasa cantidad de medio de cultivo), provocarán una mayor difusión de las drogas, por el contrario placas muy "gruesas" (exceso de medio de cultivo) provocarán una menor difusión. En cualquier caso los resultados en las lecturas de los halos serán erróneos.

Un aspecto importante es realizar el procedimiento sobre mesada o superficie perfectamente nivelada a fin de una distribución uniforme del medio en toda la placa.

Las placas que no se usan en el día pueden mantenerse en refrigerador (2-8°C.). Las placas con más de 7 días de preparación no son adecua-

das para las pruebas de sensibilidad salvo que sean envueltas en bolsas de plástico para evitar la desecación, de lo contrario deberán controlarse con microorganismos de referencia. Debe controlarse la esterilidad de cada lote de placas, incubando 24 horas o más a 30-35 °C.

Si antes de usar, hay **exceso de humedad** en la superficie de las placas, estas se deben secar a 35°C durante 10 - 30 min. Las placas deberán estar húmedas pero no mostrar gotas sobre la superficie del medio.

A2- Conservación de los discos/tabletas de antimicrobianos (ATM)

Los discos de ATM deben ser almacenados teniendo en cuenta ciertas consideraciones, ya que su deterioro ocurre si son sometidos a humedad o a frecuentes fluctuaciones de temperatura, por ello es necesario mantenerlos refrigerados a 8°C o en freezer a -14°C o menos y las tabletas a temperatura ambiente o algunas refrigeradas según indicaciones del fabricante.

Los discos que contienen drogas de la familia de ß-lactámicos deben mantenerse en freezer para mantener su potencia. Un pequeño stock para el uso diario puede mantenerse en el refrigerador.

Los discos y tabletas refrigeradas deben ser sacados del refrigerador o freezer 1 o 2 horas antes de su uso a fin de equilibrar la temperatura antes de abrir los frascos. Este proceso evita la condensación que podría ocurrir cuando la humedad ambiente alcanza los frascos fríos.

No deben usarse discos o tabletas fuera de los límites de vencimiento marcados por el fabricante.

A3- Turbidez estándar para la preparación del inóculo

Para estandarizar la densidad del inóculo se usa una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez (0,5 de la escala de McFarland). Para prepararla proceda como sigue:

- Prepare el estándar agregando 0,5 ml de $BaCl_2$ 0,048M (1,175% P/V $BaCl_2.2H_2O$) a 99,5 ml de H_2SO_4 0,18 M (0,36 N) (1% V/V).
- Verifique la densidad del estándar usando un espectrofotómetro. La absorbancia a 625 nm debería ser 0,08 - 0,10 para el estándar 0,5 de McFarland.

- Distribuya 4 - 6 ml dentro de tubos similares a los que va a usar para preparar los inóculos.
- Mantenga los estándares guardados a temperatura ambiente al abrigo de la luz.
- Agite vigorosamente el estándar antes de su uso para lograr una turbidez homogénea.
- Reemplace o verifique la confiabilidad de los estándares mensualmente.

A4- Procedimiento para realizar el ensayo de difusión por discos

Nunca deben usarse cultivos *overnight* ni otros inóculos no estandarizados para el hisopado de las placas, debiéndose evitar extremos en la densidad del inóculo.

Preparación del inóculo:

> Método de desarrollo previo

Seleccione 4 o 5 colonias bien aisladas y de igual morfología de la placa de cultivo. Prepare una suspensión homogénea en 4 o 5 ml de un caldo apropiado (por ej. Caldo Tripteina Soja) tocando la parte superior de cada colonia (Figura 1).

Incube a 35 °C hasta que este alcance o exceda la turbidez del estándar (2-6 hs).

Figura 1. Preparación de la suspensión.

Ajuste la turbidez del inóculo con solución salina o caldo hasta una turbidez correspondiente a 0,5 de la escala de McFarland, comparando visualmente con el estándar. Para ello, mire los tubos contra un fondo blanco con una línea negra como contraste (Figura 2). Esta suspensión contendrá aproximadamente 1 a 2 x 10^8 UFC/ml para *E. coli* ATCC 25922.

Figura 2. Ajuste de la turbidez del inóculo.

> Método directo de inoculación a partir de colonia aislada

Como un método alternativo, el inóculo puede ser realizado en solución salina o caldo a partir de colonias seleccionadas de una placa de cultivo no selectivo de 18 a 24 horas de incubación. Inmediatamente la suspensión debe ser ajustada a la escala 0,5 de McFarland.

Este método es de elección para microorganismos fastidiosos (*Haemophilus* spp., *Streptococcus* spp., *N. gonorrhoeae)* o para *Staphylococcus* potencialmente meticilino resistentes.

Inoculación de las placas

Dentro de los 15 minutos después de ajustado el inóculo siembre las placas de M-H con un hisopo estéril. Presione el hisopo contra las paredes del tubo a fin de escurrir el exceso de inóculo.

Inocule la superficie seca del M-H por hisopado en tres direcciones para asegurar una completa distribución del inóculo. Esto se consigue deslizando el hisopo por la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 60º cada vez y pasando por último por la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme (Figura 3).

Figura 3. Siembra del inóculo.

Espere de 3 a 5 minutos, pero no más de 15 min. antes de aplicar los antimicrobianos para que el exceso de humedad superficial sea absorbido.

Luego del desarrollo, las zonas de inhibición deberán ser uniformemente circulares y el desarrollo confluente o casi confluente. Si crecen solo colonias aisladas el antibiograma debe repetirse.

Colocación de los discos o tabletas de ATM

Colocar los discos o tabletas sobre la superficie inoculada del agar con pinza estéril aplicando una ligera presión y a una distancia no menor a 24 mm desde un centro al otro.

Figura 4. Colocación de los discos de ATB.

Debido a que algunas drogas difunden casi instantáneamente, los discos o tabletas no deben ser removidos una vez que tomaron contacto con la superficie del agar, los que se colocan en número según diámetro de las placas con el medio, no más de 12 en placa de 150 mm y no más de 6 en placas de 90 mm.

Incubar las placas invertidas a 35 °C dentro de los 15 minutos posteriores al procedimiento.

Con excepción de *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae, N. meningitidis S. pneumoniae* y *Streptococcus* spp., las placas no deberán ser incubadas en concentración incrementada de CO_2 porque los estándares de inter-

pretación fueron desarrollados usando incubación ambiente y el agregado de CO_2 alteraría significativamente el tamaño de las zonas inhibitorias para algunos agentes.

A5- Antimicrobianos seleccionados

Es evidente la imposibilidad de ensayar un gran número de antimicrobianos frente a un microorganismo determinado. La selección final dependerá del Laboratorio de Microbiología en concordancia con las decisiones del Comité de Infecciones de cada hospital.

En los documentos del CLSI (M100-S25, 2015 y anteriores) se recomiendan antimicrobianos a ensayar los que están agrupados en grupos.

En el grupo A se encuentran aquellos antimicrobianos considerados apropiados para ensayar e informar de forma rutinaria.

El grupo B está constituido por antimicrobianos que pueden ser ensayados de forma rutinaria, pero cuya información se efectuará de forma selectiva; es decir, solamente se informarán si los del grupo A no son activos, son apropiados para un lugar determinado de la infección (ej. cefalosporinas de 3º generación para enterobacterias recuperadas de líquido cefalorraquídeo o trimetoprima-sulfametoxazol en infecciones del tracto urinario), si se trata de infecciones polimicrobianas o que involucran múltiples sitios de infección, casos de pacientes alérgicos, con intolerancia o si se constata un fallo terapéutico con los antimicrobianos del grupo A, o con el propósito de controlar infecciones.

En el grupo C están incluidos antimicrobianos alternativos que podrían requerir ser estudiados cuando aparezcan problemas específicos de resistencia, como ser la presencia de cepas endémicas o epidémicas resistentes a múltiples drogas de primera línea (especialmente de la misma clase, por ejemplo a ß-lactámicos), en pacientes con alergia a antimicrobianos de primera línea, para el tratamiento de microorganismos inusuales en determinado tipo de proceso infeccioso (ej. cloramfenicol en aislamientos extraintestinales de *Salmonella* spp.) o para informar al Comité de Control de Infecciones como un dato epidemiológico complementario.

El grupo U (por su nombre en inglés “urine”, orina), incluye a antimicrobianos utilizados en infecciones del tracto urinario (por ejemplo nitrofurantoína y ciertas quinolonas) que deben ser usados solamente, o como droga de primera línea, en infecciones urinarias. Estas drogas no deben ser informadas de rutina para microorganismos aislados de otros sitios

de infección. Una excepción a esta regla es para cefazolina, que se ubica como un agente subrogante para cefalosporinas orales, frente a enterobacterias. Otros antimicrobianos de espectro más amplio podrían ser incluidos en este grupo para agentes etiológicos específicos como *P. aeruginosa* y ofloxacina.

El grupo O (otros) incluye antimicrobianos que si bien tienen indicaciones clínicas para algún grupo de microorganismos, generalmente no son candidatos para su ensayo e informe en los Estados Unidos.

Finalmente el Grupo Inv. (Investigación) incluye antimicrobianos que están siendo investigados y no han sido aún aprobados para su uso en los Estados Unidos.

La Sub-Comisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología Clínica (SADEBAC) también ha establecido recomendaciones al respecto según el tipo de microorganismo e infección. Dichas recomendaciones se encuentran publicadas en la Revista Argentina de Microbiología (acceso gratuito):

- Famiglietti A. y col. *Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en cocos gram-positivos.* Rev Arg Microbiol (2003) 35:29-40;
- Famiglietti A. y col. *Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en Enterobacteriaceae.* Rev Arg Microbiol (2005) 37:57-66; y
- Radice M. y col. *Criterios de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en los bacilos gram negativos no fermentadores de importancia clínica: recomendaciones de la Subcomisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas, Asociación Argentina de Microbiología.* Rev Arg Microbiol (2011) 43:136-153;

así como la *Actualización del Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en cocos gram-positivos. Año 2004* (http://aam.org.ar/src/img_up/30072014.4.pdf).

A6- Lectura de las placas e interpretación de resultados

Después de 16 a 18 horas de incubación, examine cada placa y mida los diámetros de las zonas de inhibición con una regla o un calibre (Figura 5).

Las zonas de los medios transparentes se miden sobre el reverso de la placa y los medios que contienen sangre sobre la superficie del agar.

Si el método fue correctamente realizado, las zonas de inhibición serán uniformemente circulares y habrá desarrollo confluente.

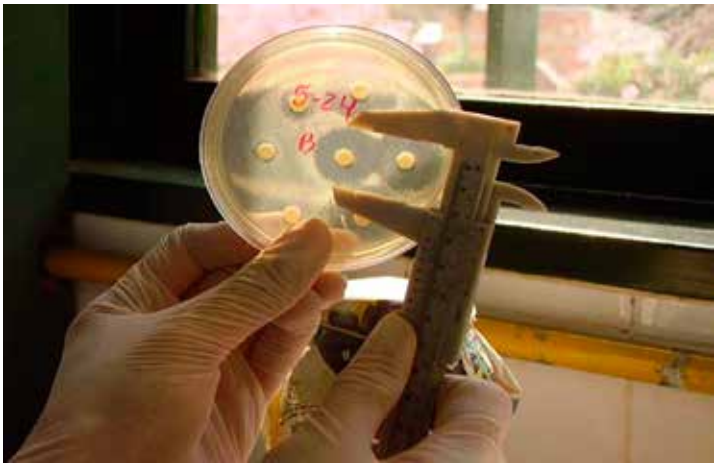


Figura 5. Medición de los halos de inhibición.

Si el microorganismo estudiado es *Staphylococcus* spp., o *Enterococcus* spp., se deben cumplir 24 horas de incubación para vancomicina y oxacilina, pero los otros antimicrobianos pueden leerse entre las 16-18 hs.

Use luz transmitida para examinar un ligero crecimiento de cepas meticilino o vancomicina resistentes dentro de las zonas de inhibición. Cualquier desarrollo dentro de la zona de inhibición es indicativo de meticilino o vancomicina resistencia.

El punto final deberá tener en cuenta el área que no muestre desarrollo obvio a ojo desnudo, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona.

Como regla general, no debe considerarse aquellas colonias diminutas que aparecen en el halo de inhibición y que han sido visualizadas mediante luz transmitida o con ayuda de una lupa, a excepción de estafilococos resistentes a oxacilina o enterococos resistentes a vancomicina.

Si se observan colonias mayores dentro del halo de inhibición de los antibióticos puede tratarse de mutantes resistentes, contaminaciones, po-

blaciones heterogéneas o cultivos mixtos y se deberán volver a identificar y realizar otra vez el ensayo de sensibilidad antimicrobiana.

Algunos *Proteus* spp., podrían presentar velo *(swarming*) dentro de las zonas de inhibición con algunos antimicrobianos. En estos casos el velo del *swarming* debería ser ignorado.

En medios suplementados con sangre, se deberá medir la zona de inhibición del crecimiento, no la zona de inhibición de la hemólisis.

Cuando se prueban discos de trimetoprima / sulfametoxazol pueden arrastrarse sustancias antagónicas que producen un crecimiento con aspecto de niebla dentro de la zona del halo de inhibición, en estos casos no considerar en la lectura un crecimiento del 20% o menos del desarrollo total.

Las lecturas de los halos de inhibición se realizarán siguiendo Tablas y recomendaciones del CLSI según sus ediciones actualizadas que se publican anualmente.

Dichas tablas indican los criterios de interpretación de los diámetros de las zonas de inhibición que categorizan con precisión el nivel de susceptibilidad de los organismos a varios agentes antimicrobianos.

Estas categorías fueron desarrolladas:

1. comparando los diámetros de inhibición con las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIMs) de un gran número de aislamientos partir de la distribución poblacional de diámetros y/o CIMs de cepas con conocida sensibilidad y resistencia,
2. las CIMs y los diámetros de inhibición correspondiente, fueron analizados en relación con la farmacocinética de la droga en los rangos de dosis normales.
3. el criterio de interpretación *in vitro* ha sido analizado en relación con estudios de eficacia clínica en el tratamiento de patógenos específicos.

Los organismos se informan, según las categorías de interpretación, como sensibles, intermedios o resistentes frente al ATM ensayado.

Sensible(S): la categoría sensible implica que los aislamientos recuperados en un tipo de infección son inhibidos por un agente antimicrobiano en una concentración usualmente alcanzable cuando se usa la dosis recomendada para ese tipo de infección y agente etiológico, a menos que existieran contraindicaciones.

Sensible dosis-dependiente (SDD): implica que la susceptibilidad de un aislamiento depende de la dosis que se utilice en un paciente. Es decir, en determinados microorganismos con SDD para que un antimicrobiano

sea efectivo será necesario adaptar la dosis (aumentar la dosis, disminuir el tiempo de administración del ATM, o ambos).

La SDD es una nueva categoría y no reemplaza a la categoría intermedia (I) que se describe abajo. Esta categoría es definida para algunas drogas donde se ha comprobado que mayores dosis pueden ser usadas clínicamente, y donde hay suficientes datos y revisiones como para ser incluidas en esta clasificación.

Intermedia (I): la categoría intermedia incluye aislamientos con concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) usualmente alcanzables en sangre o tejidos para los cuales los grados de respuesta podrían ser menores que para las cepas susceptibles.

La categoría intermedia implica eficacia clínica en los sitios del organismo donde las drogas se concentran fisiológicamente (por ejemplo quinolonas y ß-lactámicos en orina) o cuando puede usarse una alta dosis de la droga (por ejemplo ß-lactámicos).

La categoría intermedia también incluye errores en la técnica de realización del ensayo, por lo que de presentarse esta situación, es conveniente repetir la prueba, o determinar la sensibilidad de ese antimicrobiano en particular por el método de dilución en medio líquido (CIM) o de existir otras opciones terapéuticas informar como resistente.

Resistente (R): los aislamientos resistentes no son inhibidos por las concentraciones sistémicas alcanzables de un antimicrobiano en las dosis normales y/o caen en el rango donde son habituales mecanismos de resistencia específicos (por ejemplo ß-lactamasas) y no se ha observado eficacia clínica en estudios realizados.

No susceptible (NS): En aquellos aislamientos donde solo se han designado criterios de sensibilidad (S) por no existir, o no se han informado, cepas resistentes, si los halos de inhibición o la CIM son menores a los que corresponden a cepas sensibles se debe informar cómo no susceptible al antimicrobiano y no como resistente, debiendo enviarse a centros de referencia para su estudio.

Un aislamiento considerado no susceptible no necesariamente implica la presencia de un mecanismo de resistencia, ya que es posible que en cepas salvajes existan algunas cuyo punto de corte esté por arriba de los establecidos.

Por ejemplo, en las tablas de interpretación de resultados del CLSI 2015 se puede observar:

Antimicrobiano	Contenido del disco	Diámetro zona de inhibición Criterios de Interpretación (mm)			CIM Criterios de interpretación (µg/ml)		
		S	I	R	S	I	R
X	30 µg	≥20	15-19	≤14	≤4	8-16	≥32
Y	-	-	-	-	≤1	2	≥4
Z	10 µg	≥16	-	-	≤1	-	-

Así, para el antimicrobiano X si un microorganismo presenta una zona de inhibición ≥20 mm o una CIM ≤4 µg/ml se encuentra en la categoría de susceptible, mientras que si presenta una zona de inhibición ≤14 mm o una CIM ≥32 es resistente.

Para algunos antimicrobianos, como el antimicrobiano **Y** del ejemplo, solo existen criterios de interpretación realizando CIM. Para estos antimicrobianos los valores obtenidos por la técnica de difusión no se correlaciona con los valores de CIM.

Para otros antimicrobianos, como el antimicrobiano **Z** del ejemplo, solo existen criterios de interpretación para determinar sensibilidad. Si algún microorganismo pareciera ser no susceptible a estos antimicrobianos debe evaluarse como se informa más arriba al referirnos a la categoría NO susceptible (NS).

Para algunos microorganismos de aislamientos infrecuentes o fastidiosos se deben utilizar Tablas especiales (documento CLSI M45-A2, 2010 es el vigente a la fecha). Los microorganismos incluidos en dicho documento son: *Abiotrophia* y *Granulicatella* spp. (conocidos como estreptococos nutricionalmente deficientes, *Aeromonas* spp., *Bacillus* spp. (no *B. anthracis*), *Camplylobacter jejuni/coli*, *Corynebacterium* spp.(incluyendo *C. diphteriae*), *Erysipelothrix rhusiopathiae*, el grupo HACEK: *Aggregatibacter* spp. (formalmente *Haemophilus aphrophilus*, *H. paraphrophilus*, *H. segnis* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Cardiobacterium* spp., *Eikenella corrodens* y *Kingella* spp., *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Listeria monocytogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Pasteurella* spp., *Pediococcus* spp., agentes potenciales de bioterrorismo y *Vibrio* spp. incluyendo *Vibrio cholerae*.

Para aquellos microorganismos donde no existen tablas del CLSI de interpretación de resultados (por requerir medios especiales de cultivo, diferentes temperaturas de incubación o existe marcada variación en el grado de desarrollo cepa a cepa) se debe consultar con infectólogos especialistas

para determinar la necesidad de realizar o no pruebas de sensibilidad. De ser necesario, en general los métodos de dilución son los más apropiados para determinar la sensibilidad a determinada droga además del envío del microorganismo a laboratorios de referencia.

A7- Verificación de los resultados

Es importante revisar todos los resultados obtenidos para todas las drogas ensayadas sobre el aislamiento de cada paciente antes de informarlos. Esto incluye evaluar si:

- Los resultados de susceptibilidad son consistentes con la identificación del microorganismo (por ej. *Proteus* spp., es naturalmente resistente a nitrofurantoína, por lo que de observarse sensibilidad o hay un error en la técnica o no es un *Proteus* spp.)
- Los resultados para un agente perteneciente a una clase específica de antimicrobianos siguen reglas jerárquicas (en general, las cefalosporinas de 3º generación son más activas que las de 1º o 2º generación frente a *Enterobacteriaceae*, por lo que no podría una enterobacteria ser sensible a cefalosporinas de 1º y resistente a cefalosporinas de 3º)
- El aislamiento es resistente frente a aquellos agentes para los cuales la resistencia aún no ha sido documentada y solo existe la categoría "susceptible" (*Streptococcus* spp., frente a vancomicina).

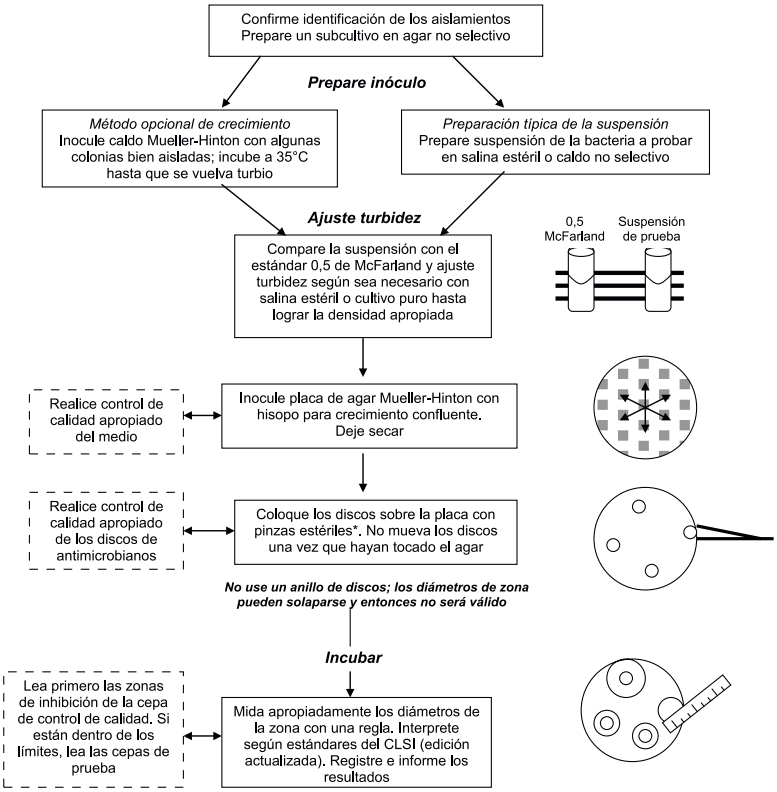
Los resultados inusuales o inconsistentes deben ser analizados para:

- Evaluar si existen errores de transcripción
- Evaluar si hubo contaminación durante el ensayo (pureza de las placas, etc.)
- Evaluar si se han utilizado paneles o discos defectuosos
- Controlar los resultados previos del paciente (¿Tuvo el paciente previamente el mismo aislamiento con un resultado inusual del antibiograma?)

Si no se puede detectar una razón para un resultado inusual o inconsistente se debe:

- Confirmar (repetir) las pruebas de identificación del microorganismo en estudio
- Repetir el ensayo de sensibilidad para confirmar los resultados.
- Salvar el aislamiento

- Enviar el aislamiento a un laboratorio de referencia.



A8- Control de calidad

El objetivo del control de calidad es el de supervisar la exactitud y fiabilidad de la metodología, debido al gran número de variables que pueden afectar los resultados. Para controlar la precisión y la exactitud del método de difusión, se cuenta con varias cepas control:

- *E. coli* ATCC® 25922, cepa no productora de ß-lactamasas. Se utiliza como control de calidad para Bacilos Gram Negativos no fastidiosos y *N. meningitidis*.

- *E. coli* ATCC® 35218, productora de ß-lactamasas (**no** ß-lactamasas de espectro extendido, BLEE) ha sido designada para el control de calidad de los discos que contengan la combinación "ß-lactámico+ inhibidor de ß-lactamasas", tales como aquellos conteniendo ácido clavulánico, sulbactama o tazobactama. Si se usa en conjunto con *E. coli* ATCC® 25922, pueden ser controlados los dos componentes de la combinación en el disco.
- *K. pneumoniae* ATCC® 700603, se usa como control en la determinación de ß-lactamasas de espectro extendido (BLEE).
- *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705, cepa productora de ß-lactamasas tipo KPC.
- *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1706, cepa resistente a carbapenemes por mecanismos distintos a la producción de carbapenemasas.
- *P. aeruginosa* ATCC® 27853, contiene una ß-lactamasa AmpC inducible.
- *S. aureus* ATCC® 29923, ß-lactamasa negativa, cepa meticilino sensible.
- *S. aureus* ATCC® 43300, cepa meticilino resistente (oxacilina resistente).
- *S. aureus* ATCC® BAA-1708, cepa con alto nivel de resistencia a mupirocina.
- *S. aureus* ATCC® BAA-976, cepa resistente a macrólidos.
- *S. aureus* ATCC® BAA-977, cepa con resistencia inducible a clindamicina.
- *E. faecalis* ATCC® 29212, para control de timina-timidina del medio. También se utiliza para controlar los discos de alta carga de aminoglucósidos (gentamicina 120 µg o estreptomicina 300 µg).
- *E. faecalis* ATCC® 51299, cepa resistente a vancomicina y con alto nivel de resistencia a aminoglucósidos.
- *H. influenzae* ATCC® 49247, cepa ß-lactamasa negativa, resistente a ampicilina.
- *H. influenzae* ATCC® 49766, cepa sensible a ampicilina.
- *N. gonorrhoeae* ATCC® 49226, cepa con resistencia cromosómica a penicilina.
- *S. pneumoniae* ATCC® 49619, cepa con susceptibilidad intermedia a penicilina. Se utiliza como control de calidad para *S. pneumoniae*, *Streptococcus* spp., y *N. meningitidis.*

> Conservación de las cepas de control de calidad

a. Las cepas de control de calidad se deben probar con los procedimientos estándar descriptos, utilizando los mismos materiales y métodos que se utilizan para las cepas clínicas.
b. Para conservar las cepas por tiempo prolongado es conveniente colocarlas en congeladores a una temperatura □ -20°C (preferiblemente a –60ºC o en nitrógeno líquido), utilizando estabilizadores adecuados (por ej.: suero fetal bovino al 50% en caldo, caldo tripticasa soja con 10 a 15% de glicerol, sangre desfibrinada de oveja o leche descremada). La liofilización es también un buen método de conservación que no altera la sensibilidad bacteriana a los antibióticos.
c. Las cepas para trabajo diario se deben conservar a 2 y 8°C en estrías de agar tripticasa soja (microorganismos comunes) o de agar chocolate enriquecido (microorganismos nutricionalmente exigentes) y deberán ser repicadas semanalmente. Los cultivos de trabajo se deben reemplazar por lo menos una vez al mes, a partir de la cepa congelada, liofilizada o de cultivo comerciales.
d. Antes de ser probadas las cepas se deben subcultivar en un medio sólido con el fin de obtener colonias aisladas. Tanto los aislamientos liofilizados como los congelados se deben repicar dos veces antes de ser usados.
e. Se debe tener especial cuidado con aquellas cepas cuyo mecanismo de resistencia esté mediados por plásmidos (*E. coli* ATCC® 35218, *K. pneumoniae* ATCC® 700603, *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705) ya que pueden perderlos espontáneamente dando lugar a resultados erróneos.
f. Los repetidos repiques de las cepas de control de calidad pueden provocar la aparición de resistencia a agentes ß-lactámicos por lo que de presentarse esta situación se debe recurrir a una cepa nueva.

Si se siguen las indicaciones de este estándar, se controlan prácticamente todos los parámetros involucrados en las pruebas de sensibilidad.

La obtención de resultados satisfactorios con las cepas patrones de control de calidad no garantiza que se obtendrán también resultados satisfactorios con los aislamientos clínicos. Cuando se obtienen resultados inconsistentes o atípicos con los aislamientos clínicos, las pruebas de sensibilidad y/o la tipificación del microorganismo deben repetirse.

La verificación de resultados inesperados dependerá de la metodología y estrategia que desarrolla cada laboratorio.

Tabla 1. Problemas que pueden surgir en la determinación de los halos de inhibición de las cepas utilizadas como control de calidad.

Observación	Diagnóstico	Solución
Halos de inhibición demasiado pequeños	1. Inóculo demasiado denso. 2. Deterioro del antibiótico. 3. Cambio en la cepa control. 4. Agar demasiado profundo. 5. pH demasiado bajo o demasiado alto. 6. Contenido catiónico incorrecto. 7. Lectura incorrecta de los resultados. 8. Aislamiento resistente	1. Comprobar y ajustar inóculo. 2. Comprobar potencia. Utilizar un disco nuevo. 3. Utilizar una cepa nueva. 4. Comprobar profundidad del agar. 5. Comprobar pH del medio (rango aceptable 7,2-7,4) 6. Utilizar nuevo medio suplementado con cationes. 7 y 8. Repetir con varios observadores.
Halos de inhibición demasiado grandes	1. Inóculo poco denso. 2. Antibiótico demasiado potente. 3. Cambio en la cepa control. 4. Agar demasiado delgado. 5. pH demasiado bajo o demasiado alto. 6. Contenido catiónico incorrecto. 7. Lectura incorrecta de los resultados 8. Aislamiento sensible	1. Comprobar y ajustar inóculo. 2. Comprobar potencia. Utilizar un disco nuevo. 3. Utilizar una cepa nueva. 4. Comprobar la profundidad del agar. 5. Comprobar pH del medio (rango aceptable 7,2-7,4) 6. Utilizar nuevo medio suplementado con cationes. 7 y 8. Repetir con varios observadores.
Superposición de halos de inhibición	1. Demasiados discos por placa	1. Disminuir el número de discos

A9- Procedimiento con microorganismos fastidiosos

Para los ensayos con cepas que no crecen satisfactoriamente en M-H no suplementado se adiciona sangre de oveja desfibrinada al medio fundido y enfriado, en una concentración final de 5 % (V/V).

Cuando la sangre se agrega al agar M-H, los límites del control de oxacilina y meticilina serán levemente menores (2-3 mm) respecto a los obtenidos con M-H no suplementado. Esto podría resultar en zonas de inhibición menores a los límites aceptables para la cepa patrón de *Staphylo-*

coccus aureus ATCC 25923. El agregado de sangre de carnero puede causar una fina película de crecimiento del microorganismo dentro de la zona de inhibición alrededor de los discos de sulfonamidas y trimetoprima.

Los métodos de rutina descriptos para los microorganismos de crecimiento rápido no son aceptables generalmente para la mayoría de los microorganismos fastidiosos, siendo necesario modificar la técnica.

La técnica de difusión por discos modificada es utilizada para microorganismos fastidiosos en particular: *H. influenzae* y *H. parainfluenzae, N. gonorrhoeae, N. meningitidis, S. pneumoniae,* y *Streptococcus* spp. Otras bacterias fastidiosas deberán ensayarse por el método de dilución. Los anaerobios no deberían ensayarse por el método de difusión por disco.

Haemophilus spp. El medio de elección para la prueba de difusión por discos para *Haemophilus influenzae* y *H. parainfluenzae* es el *Haemophilus* Test Medium (HTM). El HTM contiene los siguientes ingredientes: agar Mueller - Hinton, 15 µg/ml, ß-NAD (ß-dinucleótido adenina-nicotiamida), 15 µg/ml de hematina bovina y 5 mg/ml de extracto de levadura (pH 7,2- 7,4).

Para hacer el HTM, prepare una solución stock fresca de hematina, disolviendo 50 mg en 100 ml de OHNa 0,01 N (0,01 mol / l) con calor y agitación hasta que el polvo esté totalmente disuelto. Treinta mililitros de la solución stock de hematina son agregados a 1 litro de M-H con 5 g de extracto de levadura. Después de autoclavar y enfriar, agregue 3 ml de una solución stock de NAD (50 mg de NAD disueltos en 10 ml de agua destilada, esterilizados por filtración). **El agar chocolate no es recomendado para ensayar la sensibilidad de *Haemophilus* spp.**

Procedimiento: realice una suspensión en caldo M-H o solución salina al 0,9 % a partir de una placa de agar chocolate incubada durante 20 - 24 horas. Ajuste a una turbidez equivalente al estándar 0,5 Mc Farland (1-4 X 10^8 UFC/ml). Debe tenerse cuidado de no preparar inóculos densos que puedan llevar a resultados falsos resistentes con alguno ß-lactámicos, especialmente cuando se trabaja con *H. influenzae* productores de ß-lactamasa. Hisopee la placa de HTM dentro de los 15 min de ajustado el inóculo.

Colocar los discos en forma idéntica al descripto anteriormente para bacterias no fastidiosas, con la excepción que no deberán aplicarse más de 9 discos en las placas de 150 mm y no más de 4 discos en las placas de 100 mm. Incubar las placas por 16-18 hs en una atmósfera con 5% CO_2 a 35°C.

En la lectura se debe considerar la zona de inhibición que no presente desarrollo obvio visible. Un desarrollo débil o pequeñas colonias que po-

drían aparecer, cercanas a la zona más obvia de inhibición, deberán ser ignorados en la medición.

Neisseria gonorrhoeae: La determinación de la susceptibilidad de *N. gonorrhoeae* debe ser considerada en casos de fallas en el tratamiento. El medio recomendado para la prueba de difusión es el agar GC (agar Gelosa-Chocolate) con el agregado de 1% de suplemento de crecimiento (1,1 g L-cisteína; 0,03 g guanina HCL; 3 mg tiamina HCL, 13 mg PABA; 0,01 g B12; 0,1 g cocarboxilasa; 0,25 g NAD; 1 g adenina; 10 g L-glutamina; 100 g glucosa, 0,02 g nitrato férrico [en 1 L H_2O]), que se agrega luego del autoclavado. La suspensión equivalente al 0,5 de McFarland, se realiza directamente de las colonias desarrolladas durante 20-24 hs en agar chocolate.

Colocar los discos en forma idéntica al descripto anteriormente para bacterias no fastidiosas, con la excepción que no deberán aplicarse más de 9 discos en las placas de 150 mm y no más de 4 discos en las placas de 100 mm. Para algunos antimicrobianos como fluorquinolonas o cefalosporinas deben colocarse por placa no más de 2 a 3 discos. La incubación se realiza atmósfera de 5% de CO_2 a 35ºC durante 20 a 24 hs.

En la lectura se debe considerar la zona de inhibición que no presente desarrollo obvio visible. Un desarrollo débil o pequeñas colonias que podrían aparecer, cercanas a la zona más obvia de inhibición, deberán ser ignorados en la medición.

En *N. gonorrhoeae,* un resultado intermedio para una agente antimicrobiano indica o un problema técnico que debe ser resuelto repitiendo el ensayo o la falta de experiencia clínica en tratar los microorganismos con dichas zonas de inhibición. En cepas con zonas de susceptibilidad intermedia se ha documentado bajo porcentaje de curación (85 al 95%) comparado con > 95% de las cepas susceptibles. Los resultados sugestivos de ser considerados en la categoría de "no susceptible" deber ser confirmados por métodos de dilución.

Neisseria meningitidis: El medio recomendado para la prueba de difusión por discos es el agar M-H suplementado con 5% de sangre ovina. La suspensión se realiza directamente de las colonias desarrolladas durante 20-24 hs en agar chocolate, en una concentración equivalente al 0,5 MF.

Se deben extremar los cuidados de bioseguridad al manipular estas cepas.

Colocar los antimicrobianos en forma idéntica al descripto anteriormente para bacterias no fastidiosas, con la excepción que no deberán aplicarse más de 5 de ellos en las placas de 150 mm y no más de 2 en las placas de 100 mm. Para algunos antimicrobianos como fluorquinolonas o ce-

falosporinas deben colocarse por placa no más de 2 a 3 de ellos. La incubación se realiza atmósfera de 5% de CO_2 a 35ºC durante 20 a 24 hs.

En la lectura se debe considerar la zona de inhibición que no presente desarrollo obvio visible. Un desarrollo débil o pequeñas colonias que podrían aparecer, cercanas a la zona más obvia de inhibición, deberán ser ignorados en la medición.

El método de difusión no es aplicable para ensayar la sensibilidad de *N. meningitidis* a penicilina ni ampicilina. Para ello debe realizarse CIM.

Streptococcus pneumoniae: El medio recomendado para la prueba de difusión es el agar M-H suplementado con 5% de sangre ovina. La suspensión se realiza directamente de las colonias desarrolladas por 18-20 hs en agar sangre ovina, en una concentración equivalente al 0,5 MF.

Colocar los antimicrobianos en forma idéntica al descripto anteriormente para bacterias no fastidiosas, con la excepción que no deberán aplicarse más de 9 de ellos en las placas de 150 mm y no más de 4 de ellos en las placas de 100 mm. La incubación se realiza en atmósfera de 5% de CO_2 a 35 ºC durante 20-24 hs.

En la lectura se debe considerar la zona de inhibición que no presente desarrollo obvio visible. No se debe medir la zona de hemólisis. Un desarrollo débil o pequeñas colonias que podrían aparecer, cercanas a la zona más obvia de inhibición, deberán ser ignorados en la medición.

La sensibilidad a penicilina se determina utilizando oxacilina en concentración de 1 µg. Una cepa que presente un halo de oxacilina ≥ 20 mm es sensible a penicilina. De presentarse halos ≤ 19 mm los ensayos de susceptibilidad deberían realizarse por el método de dilución (CIM) antes de informar que la cepa es resistente a penicilina.

Streptococcus ß-hemolíticos (*S. pyogenes*, *Streptococcus* grupo C o G formadores de colonias grandes y *S. agalactiae*): El medio recomendado para la prueba de difusión es el agar M-H suplementado con 5% de sangre ovina. La suspensión se realiza directamente de las colonias desarrolladas por 18-20 hs en agar sangre ovina, en una concentración equivalente al 0,5 MF.

Colocar los discos o tabletas en forma idéntica al descripto anteriormente para bacterias no fastidiosas, con la excepción que no deberán aplicarse más de 9 de ellos en las placas de 150 mm y no más de 4 en las placas de 100 mm. La incubación se realiza en atmósfera de 5% de CO_2 a 35 ºC durante 20-24 hs.

En la lectura se debe considerar la zona de inhibición que no presente desarrollo obvio visible. No se debe medir la zona de hemólisis. Un de-

sarrollo débil o pequeñas colonias que podrían aparecer, cercanas a la zona más obvia de inhibición, deberán ser ignorados en la medición.

Streptococcus grupo *viridans* [grupo *mutans,* grupo *salivarius*, grupo *bovis*, grupo *anginosus* (antes conocido como grupo *S. milleri*), y grupo *mitis.* El grupo *anginosus* incluye cepas β-hemolíticas de los grupos A, C, F, y G formadores de colonias pequeñas]: El medio recomendado para la prueba de difusión es el agar M-H suplementado con 5% de sangre ovina. La suspensión se realiza directamente de las colonias desarrolladas por 18-20 hs en agar sangre ovina, en una concentración equivalente al 0,5 MF.

Colocar los discos o tabletas en forma idéntica al descripto anteriormente para bacterias no fastidiosas, con la excepción que no deberán aplicarse más de 9 de ellos en las placas de 150 mm y no más de 4 en las placas de 100 mm. La incubación se realiza en atmósfera de 5% de CO_2 a 35 ºC durante 20-24 hs.

En la lectura se debe considerar la zona de inhibición que no presente desarrollo obvio visible. No se debe medir la zona de hemólisis. Un desarrollo débil o pequeñas colonias que podrían aparecer, cercanas a la zona más obvia de inhibición, deberán ser ignorados en la medición.

Metodos de determinacion de sensibilidad antimicrobiana por dilución

Las técnicas de dilución en caldo o agar, se pueden utilizar para medir cuantitativamente la actividad *in vitro* de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano.

La cuantificación de esta actividad *in vitro* se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar), con la finalidad de detectar la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. El resultado final depende significativamente de la metodología empleada. Por ello, para obtener valores reproducibles intra e interlaboratorios, cada detalle técnico debe ser cuidadosamente controlado.

Las primeras determinaciones se realizaron empleando baterías de tubos con caldo de cultivo con un rango determinado de antimicrobiano (**ma-**

crodilución). Esta metodología es muy engorrosa, por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para su realización.

La aparición de un sistema de inoculación múltiple para placas de agar popularizó el método de **dilución en agar**, en el que cada placa, con una cierta concentración de antimicrobiano, permite inocular simultáneamente un gran número de microorganismos.

La utilización de micropipetas y de placas de microtitulación facilitó la utilización del método de **microdilución** con caldo. En la actualidad, se han popularizado los métodos automatizados comerciales de microdilución en caldo, fácilmente integrables en sistemas semi-automáticos de lectura e interpretación de resultados, pero con el grave inconveniente de su alto costo.

Los métodos de dilución se consideran de referencia para la determinación cuantitativa de la actividad de los antimicrobianos.

Las técnicas que se describen en el documento M100-S25 (CLSI 2015) fueron diseñadas para ensayar bacterias de fácil desarrollo después de 18 - 24 horas de incubación en medio Mueller Hinton (M-H) sin suplementos (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter* spp., *Burkholderia cepacia, Stenotrophomonas maltophilia,* otras No-*Enterobacteriaceae, Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp.) y ha sido modificado para probar algunos microorganismos nutricionalmente exigentes como *Haemophilus influenzae* y *Haemophilus parainfluenzae, Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* spp. ß-hemolíticos, *Streptococcus* spp., grupo viridans y anaerobios.

Para algunos microorganismos de aislamientos infrecuentes o fastidiosos se deben utilizar Tablas especiales (documento CLSI M45-A2, 2010 es la vigente a la fecha). Estos microorganismos son: *Abiotrophia* y *Granulicatella* spp. (conocidos como estreptococos nutricionalmente deficientes, *Aeromonas* spp., *Bacillus* spp. (no *B. anthracis*), *Camplylobacter jejuni/coli*, *Corynebacterium* spp.(incluyendo *C. diphteriae*), *Erysipelothrix rhusiopathiae*, el grupo HACEK: *Aggregatibacter* spp. (formalmente *Haemophilus aphrophilus*, *H. paraphrophilus*, *H. segnis* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Cardiobacterium* spp., *Eikenella corrodens* y *Kingella* spp., *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Listeria monocytogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Pasteurella* spp., *Pediococcus* spp., agentes potenciales de bioterrorismo y *Vibrio* spp., incluyendo *Vibrio cholerae*.

Para aquellos microorganismos donde no existen tablas del CLSI 2015 de interpretación de resultados (por requerir medios especiales de

cultivo, diferentes temperaturas de incubación o existe marcada variación en el grado de desarrollo cepa a cepa) se debe consultar con infectólogos especialistas para determinar la necesidad de realizar o no pruebas de sensibilidad. De ser necesario, en general los métodos de dilución son los más apropiados para determinar la sensibilidad a determinada droga además del envío del microorganismo a laboratorios de referencia.

El valor de la CIM obtenido por el método de dilución, orienta al clínico sobre que concentración de antibiótico necesita alcanzar en el sitio de infección para inhibir el microorganismo infectante. La CIM, sin embargo, no representa un valor absoluto.

La determinación de la actividad antimicrobiana mediante técnicas de dilución se realiza utilizando una escala discontinua (habitualmente concentraciones crecientes en base 2) en vez de una escala continua (como sucede en el método de difusión), por lo que los valores de CIM reales de un determinado antimicrobiano se encontrarán en algún valor situado entre la CIM experimentalmente obtenida y la concentración inmediatamente inferior.

Desde el punto de vista clínico la diferencia entre los valores real y experimental de CIM no suelen ser trascendentes cuando se trata de concentraciones bajas, pero pueden tener importancia para las CIMs altas que se acerquen a las concentraciones alcanzables in vivo.

También existen otros esquemas de dilución, que utilizan unas pocas concentraciones (hasta dos), concentraciones *breakpoint* o que agregan concentraciones entre las que se ensayan normalmente (por ej. 4, 6, 8, 12, 16 µg/ml). Los resultados de estos métodos alternativos pueden ser igualmente útiles en la clínica; sin embargo, a veces son más difíciles de controlar. Cuando se produce inhibición del crecimiento con la menor concentración utilizada el verdadero valor de la CIM no se puede determinar exactamente y debe informarse como igual o menor que dicha concentración. Cuando se ensayan concentraciones adicionales entre las usuales y la CIM es una de esas concentraciones intermedias, la interpretación de la prueba se debe hacer después de redondear el valor a la próxima superior dilución al medio del esquema normal (por ej. una CIM de 6 µg/ml se debe redondear a 8 µg/ml y luego interpretar).

Debe tenerse en cuenta que, a pesar de realizar las pruebas de dilución bajo condiciones cuidadosamente controladas no siempre se obtienen los mismos resultados. Generalmente, la reproducibilidad de esta prueba es de ± 1 dilución.

Cuando se informa al clínico el resultado de la CIM, el valor debe ser acompañado por su correspondiente interpretación (por ej. SENSIBLE, INTERMEDIO o RESISTENTE) que se obtiene aplicando los criterios y sugerencias del CLSI 2015. Cuando las CIMs se realizan con 4 o menos concentraciones consecutivas, o con concentraciones no consecutivas, se debe informar la correspondiente interpretación. Si se desea se puede informar además el rango de CIM.

B1. Agentes antimicrobianos

Los antimicrobianos, estándar o de referencia, a usar en las técnicas de dilución pueden obtenerse de los correspondientes fabricantes, o comprarse directamente en compañías comerciales.

Para los estudios *in vitro* no es adecuado utilizar las preparaciones de uso clínico, sino que deben emplearse sustancias valoradas de las que se conozcan la potencia (mg de sustancia pura por cada mg de sustancia valorada), la fecha de vencimiento y el lote de preparación. Las sustancias valoradas deben conservarse siguiendo estrictamente las indicaciones del proveedor, por lo general en un desecador que se mantiene en heladera o en freezer. En el caso de usar desecadores para la conservación, hay que evitar la formación de agua de condensación por lo que, tras sacarlos del frigorífico/congelador, se deben abrir sólo cuando hayan alcanzado la temperatura ambiente.

A todos los agentes antimicrobianos se les realiza el ensayo de actividad. La actividad de una determinada droga puede variar entre los distintos productores y entre los distintos lotes del mismo productor. Por esto es muy importante conocer el dato de potencia de cada frasco de antimicrobiano que va a ser utilizado para realizar pruebas de sensibilidad por dilución y sobre la base de dicho dato, hacer los cálculos para le preparación de las soluciones a utilizar.

Para determinar la cantidad del antimicrobiano puro o del solvente necesarios para preparar una solución estándar (SE) se puede utilizar alguna de las siguientes fórmulas:

Fórmula 1:

$$\text{Pesada de ATB (mg)} = \frac{\text{Volumen SE (ml) x Concentración de SE (µg/ml)}}{\text{Potencia de ATB (µg/mg)}}$$

Fórmula 2:

$$\text{Volumen de SE (ml)} = \frac{\text{Pesada de ATB (mg) x Potencia de ATB (µg/mg)}}{\text{Concentración de SE (µg/ml)}}$$

La pesada del antimicrobiano a ensayar se debe hacer en balanza analítica bien calibrada, con una precisión igual o superior al décimo de miligramo, y se debe evitar pesar cantidades muy pequeñas de droga ya que estas acarrean alto error (si es posible se recomienda pesadas superiores a los 100 mg). Para conseguir una determinada concentración, lo más sencillo es pesar con un ligero exceso una cantidad de sustancia valorada y, posteriormente, añadir el volumen de diluyente necesario.

Se deben preparar soluciones madres de por lo menos 1000 µg/ml (por ej.: 1280 µg/ml) o de una concentración 10 veces mayor que la más alta del rango establecido [por ej.: para un rango establecido de 2 a 512 µg/ml se podría preparar una solución madre de 5120 µg/ml).

En algunos casos el límite de solubilidad del antimicrobiano sólo permite preparar soluciones de concentraciones bajas. Para las drogas que no son solubles en agua, se debe proceder de la siguiente manera:

1. Use solamente la cantidad mínima del solvente [metanol, acetona, cloroformo, etc.] necesaria para solubilizar la droga.
2. Diluya hasta alcanzar el volumen final calculado, con agua, buffer o el diluyente adecuado como se indica en la Tabla 2.
3. Si se van a utilizar solventes potencialmente tóxicos, asegúrese de tomar todos los recaudos necesarios para el manejo que indica el fabricante (ver Tabla 2).

Las soluciones de antimicrobianos se deben emplear el mismo día de su preparación. Alternativamente, se pueden congelar en alícuotas (usando tubos estériles de vidrio o plástico). La temperatura ideal para la conservación de estas soluciones es de al menos -60ºC, y en todo caso nunca superior a los -20ºC. Se acepta que a temperaturas de -60ºC las soluciones madres de antimicrobianos son estables, con muy contadas excepciones, durante al menos 6 meses.

Tabla 2. Solventes y Diluyentes para la preparación de soluciones stock de agentes antimicrobianos (adaptada de CLSI 2015).

Agentes Antimicrobianos	Solvente	Diluyente
Amoxicilina, ac.clavulánico (fosfato), ticarcilina, ticarcilina-clavulánico, cefazolina, cefepima, cefuroxima	Buffer fosfato pH 6. 0,1 mol/l	Buffer fosfato pH 6. 0,1 mol/l
Ampicilina	Buffer fosfato pH 8. 0,1 mol/l	Buffer fosfato pH 8, 0,1 mol/l
Azitromicina	Etanol 95% o ácido acético glacial	Caldo de cultivo
Aztreonam	Sol. saturada bicarbonato Na	Agua
Cefixima (Fosfato)	Buffer fosfato pH 6. 0,1 mol/l	Buffer fosfato pH 7, 0,1 mol/l
Cefotetan	Dimetil sulfóxido	Agua
Cefpodoxima	Bicarbonato de Na acuoso (0,10%; 11,9 mmol/l)	Agua
Ceftazidima	Carbonato de sodio	Agua
Cefalotina, cefalexina,	Buffer fosfato pH 6. 0,1 mol/l	Agua
Cloramfenicol	Etanol 95%	Agua
Eritromicina	Etanol 95% o ácido acético glacial	Agua
Enoxacina, fleroxacina, norfloxacina, ofloxacina, levofloxacina.	½ volumen de agua, luego agregar NaOH 0,1mol/l gota a gota hasta disolución	Agua
Ac.nalidíxico, cinoxacina	½ volumen de agua, luego agregar NaOH 1mol/l gota a gota hasta disolución	Agua
Claritromicina	Metanol o ácido acético glacial	Buffer fosfato pH 6,5, 0,1 mol/l
Imipenem, ertapenem	Buffer fosfato pH 7,2, 0,01 mol/l,	Buffer fosfato pH 7,2, 0,01 mol/l
Moxalactam (sal diamonio)	HCl 0,04 mol/l reposar 1,5 a 2 horas	Buffer fosfato pH 6. 0,1 mol/l
Nitrofurantoína	Buffer fosfato pH 8, 0,1 mol/l	Buffer fosfato pH 8. 0,1 mol/l
Rifampicina	Metanol (máxima concentración = 640µg/ml)	Agua (con agitación)
Sulfonamidas	½ volumen de agua caliente y cantidad mínima de NaOH 2,5 mol/l hasta disolver	Agua

Trimetoprima	Ácido láctico o clorhídrico 0,05 mol/l, 10% del volumen final	Agua (puede requerir calor)
Telitromicina	Ácido acético glacial	Agua
Amicacina, carbenicilina, cefaclor, cefoperazona, cefotaxima, cefoxitina, ceftizoxima, ceftriaxona, ciprofloxacina, clindamicina, colistín, daptomicina, doxiciclina, fosfomicina, ácido fusídico, gatifloxacina (con agitación), gentamicina, kanamicina, linezolid, loracarbef, meropenem, meticilina, minociclina, moxifloxacina, mupirocina, netilmicina, oxacilina, penicilina, piperacilina, polimixina B, quinupristin-dalfopristin, espectinomicina, estreptomicina, sulbactam, tazobactam, teicoplanina, tetraciclina, tigleciclina, trimetoprima (lactato), tobramicina, vancomicina	Agua	Agua

a. La formulación de colistín usadas en los ensayos de susceptibilidad es colistín sulfato y no colistín sulfometato.
b. La sal diamonio de moxalactam es muy estable, pero es en su mayor parte un isómero R puro. Moxalactam para uso clínico es una mezcla 1:1 de los isómeros R y S. Por lo que, la sal disuelta en 0.04 mol/L de HCl y se debe dejar que reaccione por 1.5 a 2 horas a fin de convertirla en partes iguales de ambos isómeros.
c. Alternativamente, nitrofurantoína puede ser disuelta en dimetil sulfóxido.
d. El carbonato anhidro de sodio es usado a un peso que corresponde exactamente al 10% de la ceftazidima a utilizar. El carbonato sódico se disuelve en más del agua necesaria. El antibiótico es disuelto en dicha solución de carbonato sódico y se agrega agua hasta el volumen deseado. La solución debe ser utilizada lo más pronto posible, pero puede ser almacenada hasta seis horas a no más de 25°C.
e. Para ácido acético glacial, usar ½ volumen de agua, luego agregar el ácido gota a gota hasta disolver, no excederse de 2,5 µl/ml.
f. Para preparar las soluciones madres de aquellos antimicrobianos cuya actividad se expresa en Unidades Internacionales (UI) proceda de la siguiente manera:

Antimicrobiano	Potencia (de referencia)	Cálculo de µg/ml
Penicilina G (potasio)	0,625 µg/unidad	Multiplicar la potencia expresada en unidades/mg por 0,625 µg/unidad
Penicilina G (sodio)	0,6 µg/unidad	Multiplicar la potencia expresada en unidades/mg por 0,6 µg/unidad
Colistín (sulfato)	30000 unidades/mg= 30 unidades/µg= 0,03333 µg/unidad	Multiplicar la potencia expresada en unidades/mg por 0,03333 µg/unidad
		Dividir la potencia expresada en unidades/mg por 30 unidades/µg
Estreptomicina	785 unidades/mg	Dividir el número de unidades por 785. Esto dará el porcentaje de pureza. Multiplicar dicho porcentaje por 850, que es la cantidad de forma pura de estreptomicina presente en la droga. Este valor es igual a la potencia expresada en µg/mg.

Cada vez que se descongela un vial se debe utilizar en el día y el sobrante del mismo debe descartarse. Nunca se debe volver a congelar una solución de antimicrobiano. Si existe deterioro de la actividad en las soluciones almacenadas se verá reflejado en los resultados de las cepas de control de calidad que deben acompañar a cada determinación.

La contaminación de las soluciones es extremadamente rara, por lo tanto pueden utilizarse soluciones no esterilizadas. Si se desea, las soluciones pueden ser esterilizadas por filtración a través de membranas; se debe tener la precaución de no utilizar materiales que adsorban ATB (como por ejemplo: papel, asbestos o filtros de vidrio sinterizado).

B2. Número de concentraciones a ensayar

Las concentraciones a ensayar para un determinado antimicrobiano en general deberían determinarse de acuerdo a los puntos de corte sugeridos por el CLSI 2015, pero el número de concentraciones deberá ser elegido por quien realiza la prueba. Sin embargo, se recomienda elegir el rango de concentraciones de manera tal que incluya el rango de CIM de al menos una cepa patrón de control de calidad.

En algunos casos especiales puede ser necesario ensayar concentraciones inusuales (por ej. para evaluar el efecto sinérgico entre aminoglucósidos y penicilinas o glucopéptidos frente a enterococos puede ser necesario ensayar altas concentraciones de gentamicina y estreptomicina).

B3. Turbidez estándar para la preparación del inóculo

Para estandarizar la densidad del inóculo se usa una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez (0,5 de la escala de Mc Farland). Para prepararlo proceda como sigue:

- Prepare el estándar agregando 0,5 ml de $BaCl_2$ 0,048M (1,175% P/V $BaCl_2$ $2H_2O$) a 99,5 ml de H_2SO_4 0,18 M (0,36 N) (1% V/V).
- Verifique la densidad del estándar usando un espectrofotómetro. La absorbancia a 625 nm debería ser 0,08 - 0,10 para el estándar 0,5 de Mc Farland.
- Distribuya 4 - 6 ml dentro de tubos similares a los que va a usar para preparar los inóculos.
- Mantenga los estándares guardados a temperatura ambiente al abrigo de la luz.
- Agite vigorosamente el estándar antes de su uso para lograr una turbidez homogénea.
- Reemplace o verifique la confiabilidad de los estándares mensualmente.

B4. Metodo de dilucion en agar

La dilución en agar es un método bien establecido para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos. El agente antimicrobiano se incorpora dentro del medio con agar, de manera tal que cada placa contenga una concentración de antibiótico diferente. Los inóculos de los distintos microorganismos se pueden aplicar rápida y simultáneamente sobre la superficie del agar utilizando un replicador de Stern.

Figura 7. Replicador de Stern (multi-inoclador).

> B4.1. Medio de cultivo

El M-H demostró ser, de todos los medios disponibles, el mejor para las pruebas de sensibilidad de rutina de bacterias no fastidiosas, por las siguientes razones:

- Muestra buena reproducibilidad de los resultados de sensibilidad entre distintos lotes.
- Tiene baja cantidad de inhibidores para sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclinas.
- Permite buen crecimiento de la mayoría de los patógenos.
- Se tiene gran cantidad de datos y experiencia sobre pruebas de sensibilidad realizadas con este medio.

Aunque el M-H es un medio confiable para realizar las pruebas de sensibilidad, los resultados obtenidos con algunos lotes, en ocasiones, pueden variar significativamente. Los lotes nuevos de medio deben ser controlados antes de ser usados en clínica.

El agar M-H se debe preparar a partir del polvo deshidratado según las recomendaciones del fabricante. Después de autoclavar, el agar se debe enfriar en baño de agua a 48-50°C antes de agregarle en forma estéril, las soluciones de antimicrobianos y/o suplementos sensibles al calor, y finalmente colocarlo en las placas correspondientes.

El pH del M-H se debe controlar cada vez que se prepara un nuevo lote. La metodología a emplear dependerá del tipo de equipamiento disponible en cada laboratorio. El pH del M-H debe estar entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente, por lo tanto se debe probar después de solidificado. La determinación del pH es muy importante porque a valores bajos algunas

drogas pierden actividad (por ej.: aminoglucósidos y macrólidos) y otras la incrementan (por ej.: penicilinas). Si el pH es demasiado alto se observa el efecto opuesto.

- El pH se puede determinar de alguna de las siguientes maneras:
- Macerando la cantidad suficiente de agar para que el bulbo del electrodo del pHmetro quede totalmente sumergido.
- Permitiendo que una pequeña cantidad de agar solidifique alrededor del bulbo del electrodo del pHmetro.
- Mediante el uso de un electrodo de superficie bien calibrado.

No es necesario adicionar cationes al M-H. El agregado de suplementos se realiza sólo cuando es necesario determinar la sensibilidad de microorganismos que no crecen sin ellos. Los suplementos utilizados son sangre desfibrinada de oveja o caballo al 5% (v/v). El pH debe ser determinado después de agregar el suplemento al medio estéril.

> B4.2. Procedimiento

Para la preparación de las placas, agregue la solución de antimicrobiano apropiada para cada dilución, en el agar fundido y enfriado a 48 - 50°C en baño de agua.

Agite la mezcla agar-antimicrobiano y colóquela en la placa de Petri hasta alcanzar una profundidad de 3-4 mm.

La mezcla agar-antibiótico debe ser colocada rápidamente en las placas para evitar la solidificación total o parcial de la misma dentro del recipiente de mezclado.

Si las placas no se usan de inmediato se pueden guardar a 4-8°C por 5 días para ensayos de referencia o por mayor tiempo para uso de rutina. El almacenamiento de las placas se debe hacer en bolsas de plástico para evitar su desecación.

Las placas que contienen antimicrobianos particularmente lábiles como cefaclor, ampicilina, meticilina, imipenem y ácido clavulánico no pueden guardarse más de 48 hs antes de su utilización debido a la rápida degradación de la droga.

No se puede asegurar que todos los antimicrobianos mantengan su actividad en estas condiciones, por lo tanto siempre es necesario evaluar el estado de los mismos mediante la prueba de cepas patrones de control de calidad. En general, se recomienda el control de calidad semanal de las pla-

cas dado que algunas drogas necesitan controlarse con mayor frecuencia debido a que se degradan rápidamente.

Antes de ser utilizadas, las placas deben ser equilibradas a temperatura ambiente y no deben tener gotas de agua sobre la superficie. Si las placas estuvieran mojadas se deben colocar a secar, por aproximadamente 30 minutos, para eliminar el exceso de agua.

Para la preparación de las diluciones se utiliza, en general, el esquema de la Tabla 3 que recomienda la dilución de una parte de la solución de antimicrobiano en 9 partes del agar fundido.

Para cada serie de concentraciones se debe incluir al comienzo y al final de las mismas sendas placas de medio sin antimicrobiano que servirán para controlar el crecimiento y la posibilidad de contaminación durante el proceso de inoculación. El agregado o no de suplementos dependerá de las necesidades nutricionales de la bacteria en estudio.

Tabla 3. Esquema para la preparación de soluciones de agentes antimicrobianos para ser usados con el método de dilución en agar. (Adaptada de CLSI 2015)

Solución de antimicrobiano							
Paso	Concentración (µg/ml)	Origen	Volumen (ml)	Diluyente (ml)	Concentración Intermedia	Concentración final al diluir 1/10 en agar	Log_2
	5120	Stock	-	-	5120	512	9
1	5120	Stock	2	2	2560	256	8
2	5120	Stock	1	3	1280	128	7
3	5120	Stock	1	7	640	64	6
4	640	Paso 3	2	2	320	32	5
5	640	Paso 3	1	3	160	16	4
6	640	Paso 3	1	7	80	8	3
7	80	Paso 6	2	2	40	4	2
8	80	Paso 6	1	3	20	2	1
9	80	Paso 6	1	7	10	1	0
10	10	Paso 9	2	2	5	0,5	-1
11	10	Paso 9	1	3	2,5	0,25	-2
12	10	Paso 9	1	7	1,25	0,125	-3

> B4.3. Preparación del inóculo e inoculación de las placas

Los replicadores suelen dispensar gotas (de aproximadamente 5 mm de diámetro) con un volumen de 1 a 2 µl. El inóculo que debe contener cada una de estas gotas debe ser de aproximadamente 10^4 UFC/ ml, por lo que la suspensión original a usar con el replicador debe tener 10^7 UFC/ml. Esta suspensión produce una turbidez difícil de medir, por lo que habitualmente se prepara una suspensión de 10^8 UFC/ml que posteriormente se diluye 1:10.

En la mayoría de los laboratorios esta turbidez se prepara por comparación visual (o espectrofotométrica) con la que corresponde al estándar 0,5 de la escala de Mc Farland (densidad óptica de 0,08-0,10 a 625 nm, equivalente a 1-2 x 10^8 UFC/ml para la mayoría de los microorganismos no exigentes). Una vez preparado el inóculo debe usarse antes de 15 minutos.

Se colocará una alícuota de cada uno de los inóculos en los correspondientes pocillos del replicador. Para la inoculación se deben preparar las series de placas de modo que se comience inoculando un control sin antimicrobiano, se continúa inoculando a partir de la placa con menor concentración del mismo y se finaliza sembrando una nueva placa de control sin antimicrobiano para confirmar que no hubo contaminación o un significativo efecto "carry over" de antibiótico durante el procedimiento.

Cada uno de los inóculos se debe sembrar en aislamiento en una placa sin antimicrobiano para comprobar posteriormente la pureza de los mismos, y si fuera necesario disponer de un cultivo fresco tras la correspondiente incubación en caso que la prueba se deba repetir.

Las placas inoculadas se dejarán a temperatura ambiente hasta que las gotas de inóculo estén secas. Posteriormente se incuban a 35ºC durante 16 a 20 horas, excepto para *Staphylococcus* meticilino resistentes y enterococos vancomicino resistentes, y se procede a su lectura. Cuando se prueban microorganismos sin exigencias nutricionales se deben incubar las placas sin atmósfera de CO_2, ya que este procedimiento puede alterar el pH de la superficie del agar.

La CIM es la menor concentración de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento bacteriano (no se considera crecimiento la aparición de una colonia aislada o de un halo tenue debido al propio inóculo).

Ocasionalmente pueden verse algunas colonias o franco crecimiento en concentraciones superiores a la CIM aparente; en estos casos se debe

comprobar la pureza del inóculo para descartar una contaminación; si esta última se confirma deberá repetirse el estudio.

Algunos antagonistas del medio de cultivo pueden permitir un leve desarrollo bacteriano cuando se ensaya trimetoprima o sulfonamidas. El punto final en estos casos corresponderá a la concentración en la que haya más del 80 % de reducción del crecimiento comparando con el control.

Figura 8. Método de dilución en agar. Placa de la izquierda sin antimicrobiano. Placa de la derecha con antimicrobiano en concentración de 1 µg/mL.

B5. Metodo de dilución en caldo (macro y microdilución)

Existen dos modalidades de los métodos de dilución, en las que se utilizan tubos (macrométodo) o placas de microtitulación (micrométodo).

> B5.1. Medio de cultivo

El caldo M-H es el medio recomendado para las pruebas de sensibilidad de patógenos aeróbicos o facultativos de crecimiento rápido.

La reproducibilidad de los resultados de las pruebas de sensibilidad utilizando diferentes lotes de este medio es buena; tiene bajo contenido de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina y permite el crecimiento de la mayoría de los gérmenes patógenos. Además se han acumulado un gran número de resultados y experiencias utilizando este medio para las pruebas de sensibilidad.

El caldo M-H se puede suplementar para permitir el crecimiento de bacterias nutricionalmente exigentes, por ejemplo: (HTM) Medio para prueba de *Haemophilus* spp. Para determinar la sensibilidad de los estreptococos se debe agregar sangre.

Las características químicas y el comportamiento en las pruebas de sensibilidad del caldo M-H se deben controlar de rutina.

El pH de este medio se debe determinar después de preparado. La determinación se debe hacer con pHmetro a temperatura ambiente (25°C) y debe estar entre 7,2 y 7,4.

Si el caldo M-H no tiene las cantidades correctas de cationes divalentes Ca^{++} (20-25 mg/l) y Mg^{++} (10-12,5 mg/l), las CIM de aminoglucósidos frente a *P. aeruginosa* y la CIM de tetraciclina frente todas las bacterias, podrían ser diferentes de los resultados obtenidos por el método de dilución en agar.

Algunos fabricantes proveen el caldo M-H con la concentración de cationes adecuada. Por lo tanto sólo se debe ajustar el contenido de cationes de los medios que no tengan la certificación del fabricante en cuanto a la concentración de calcio y magnesio o cuando la determinación de estos cationes por espectrofotometría de absorción atómica indique que están en defecto. Por otra parte el agregado de cationes en exceso puede conducir también a resultados erróneos.

Para realizar el ajuste de la concentración de cationes:

- La solución madre de $MgCI_2$ debe contener 10 mg/ml de Mg^{++} (Disuelva 8,36 g de $MgCI_2$ $6H_20$ en 100 ml de agua desionizada).
- la solución madre de $CaCI_2$ debe contener 10 mg/ml de Ca^{++} (Disuelva 3,68 g de $CaCI_2$ 2 H_20 en 100 ml de agua desionizada).
- Las soluciones madres deben ser esterilizadas por filtración a través de membranas y conservadas a 4°C.

El caldo M-H se debe preparar según las directivas del fabricante, autoclavar y, antes de suplementar con los cationes, enfriar una noche a 4°C o en baño de hielo (si se necesita utilizar el mismo día). Los medios comerciales contienen pequeñas cantidades de calcio y magnesio, por lo tanto dichas cantidades se deben tener en cuenta en el momento de realizar los cálculos para suplementar el medio M-H.

Agregando 0,1 ml de cada solución madre a 1 litro de caldo M-H se incrementa en 1 mg/l la concentración de Ca^{++} y Mg^{++}. A este medio se lo denomina caldo M-H suplementado con calcio y magnesio (CAMHB).

Si el caldo M-H provisto por el fabricante contiene las concentraciones correctas de calcio y magnesio (20-25 mg/l de Ca^{++} y 10-12,5 mg/l de Mg^{++}), no es necesaria la suplementación.

Las características de cada lote de medio se evalúan utilizando cepas patrones de control de calidad. Si al realizar las pruebas de sensibilidad con un lote nuevo de caldo M-H, no se obtienen las CIMs esperadas para las cepas patrones, deben controlarse, tanto el contenido de cationes divalentes, como otras posibles variables de la prueba.

Para determinar si el medio es adecuado para probar la sensibilidad a sulfonamidas y trimetoprima, se debe realizar la CIM de estas drogas frente a *E. faecalis* ATCC 29212. El punto final debe ser fácil de leer (80 % de reducción en el desarrollo comparado con el control). El medio se considera adecuado si el valor de la CIM es ≤0,5/9,5 µg/ml.

> B5.2 Preparación de las diluciones

Método de Macrodilución en caldo

La prueba se realiza en tubo de hemólisis (13 x 100 mm) estériles. Para cada microorganismo ensayado se debe dejar, como control, un tubo que contenga caldo sin el antimicrobiano. Los tubos deben estar tapados con algodón o tapas de plástico o metal.

Preparar las sucesivas diluciones al medio del antimicrobiano en caldo (ver esquema en Tabla 4). El volumen final mínimo, requerido en cada tubo, es de 1 ml.

Para medir todos los diluyentes y para agregar la solución del antimicrobiano al primer tubo se puede utilizar la misma pipeta. Para llevar a cabo cada dilución del rango se debe utilizar una nueva pipeta.

Se debe tener en cuenta que con el agregado de la suspensión bacteriana, las concentraciones del antimicrobiano en cada tubo se diluirán al medio; por lo tanto dichas concentraciones deben ser preparadas al doble de la concentración final deseada.

Método de Microdilución en caldo

Este método se denomina microdilución porque involucra pequeños volúmenes de caldo. La prueba se realiza en policubetas de plástico estériles de

fondo cónico o redondo, cada pocillo debe contener 0,1 ml de caldo. Las drogas pueden diluirse como se describe en la Tabla 3.

El método más conveniente para obtener las diluciones, consiste en prepararlas en un volumen de por lo menos 10 ml y colocar 0,1 (± 0.02) ml en cada uno de los 96 pocillos mediante un dispositivo mecánico (pipeta automática mono o multicanal). Si el inóculo se agrega con pipeta, la solución de antimicrobiano se debe preparar de una concentración tal, que duplique la deseada y los pocillos deben ser cargados con 0,05 ml en vez de 0,1 ml. Cada policubeta debe incluir un pocillo de control de crecimiento (sin antimicrobiano), y un control negativo (caldo sin inocular).

Las policubetas, con las diluciones cargadas, se deben sellar inmediatamente después de preparadas en una bolsa de plástico y guardarse a –20°C (si es posible a una temperatura igual o menor que –60°C) hasta el momento de su utilización.

La mayoría de los antimicrobiano conservados de esta manera se mantienen estables por varios meses pero algunos (por ej. ác. clavulánico, cefaclor, oxacilina, imipenem, etc.) pueden ser más lábiles por lo que deben almacenarse a una temperatura inferior a los –60°C. Las policubetas con las soluciones de antimicrobiano no deben ser guardadas en freezer auto-descongelantes, y una vez descongeladas, no debe volver a congelarse, ya que este procedimiento deteriora rápidamente algunos de ellos, particularmente los ß-lactámicos.

Tabla 4. Esquema para la preparación de soluciones de agentes antimicrobianos para ser usados con el método de dilución en caldo. (Adaptada de CLSI 2015).

Solución de antimicrobiano						
Paso	Concentración (µg/ml)	Origen	Volumen[a] (ml)	CAMHB[b] Volumen[a] (ml)	Concentración final (µg/ml)	Log_2
1	5120	Stock	1	9	512	9
2	512	Paso 1	1	1	256	8
2	512	Paso 1	1	3	128	7
4	512	Paso 1	1	7	64	6
5	64	Paso 4	1	1	32	5
6	64	Paso 4	1	3	16	4
7	64	Paso 4	1	7	8	3
8	8	Paso 7	1	1	4	2
9	8	Paso 7	1	3	2	1

10	8	Paso 7 1	7	1	0
11	1	Paso 10 1	1	0,5	-1
12	1	Paso 10 1	3	0,25	-2
13	1	Paso 10 1	7	0,125	-3

- Los volúmenes seleccionados pueden ser cualquier múltiplo de esas figuras, dependiendo del número de ensayos a realizar.
- CAMHB, Caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes. De ser necesario, el ajuste de cationes, se realiza antes de este paso.

> B5.3. Preparación del inóculo e inoculación de los tubos/pocillos

El inóculo estándar, tanto para macro como para microdilución en caldo, se puede obtener por crecimiento del microorganismo hasta una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland o por suspensión directa de colonias, en caldo o solución fisiológica, hasta alcanzar dicha turbidez.

Una vez obtenido el inóculo de turbidez comparable al 0,5 de Mc Farland, diluir en caldo (macrométodo) o en solución fisiológica o agua (micrométodo) para ajustar el inóculo de manera tal, que luego de colocado, cada pocillo o tubo contenga aproximadamente 5 x 10^5 UFC/ml.

La inoculación con la suspensión estandarizada debe hacerse dentro de los 15 minutos de preparada la misma, para evitar que el número de microorganismos aumente por duplicación.

La concentración del inóculo ajustado puede variar dependiendo del método de inoculación utilizado y del microorganismo en estudio, por lo tanto se debe calcular para cada situación. Para realizar este cálculo se debe decidir el volumen exacto en el cual se va a realizar la inoculación.

Periódicamente se deben realizar recuentos de colonias para verificar que la concentración del inóculo final obtenido rutinariamente por el laboratorio se aproxime a 5 x 10^5 UFC/ml para *E. coli* ATCC 25922.

Esto se puede realizar fácilmente tomando alícuotas de 0,01 ml del pocillo o del tubo control de crecimiento inmediatamente después de la inoculación y diluirlos en 10 ml (dilución 1:1000) de solución fisiológica (9 g/l de NaCI).

Después de homogeneizar, se toma una alícuota de 0,1 ml y se distribuye sobre la superficie de una placa de agar con un medio apropiado para el desarrollo bacteriano; se incuba una noche y la presencia de 50 colonias

indica que la densidad de inóculo final fue de 5 x 10^5 UFC/ml. Si se utiliza dilución en agar, la muestra se debe tomar al azar de alguno de los reservorios de la cubeta del replicador.

Luego de realizada la CIM, una muestra de cada inóculo se debe reaislar sobre una placa de agar. Examinar después de una noche de incubación para detectar cultivo mixto.

Esta placa servirá también como fuente de cultivo fresco si, por alguna razón, se necesita repetir la prueba. Este control es muy útil sobre todo cuando se utiliza la técnica de dilución en caldo, donde los cultivos mixtos son difíciles de detectar.

Una vez preparado el inóculo,

Macrodilución en caldo (tubos): Se agrega 1 ml del inóculo estandarizado a cada tubo de dilución de antimicrobiano y al tubo control de crecimiento y se homogeneiza la mezcla. No deben transcurrir más de 15 minutos entre la preparación del inóculo y su colocación en el tubo.

Se debe tener en cuenta que tanto el antimicrobiano, como el inóculo sufrirán una dilución al medio. Es aconsejable realizar un control de pureza del inóculo subcultivando una alícuota en un medio sólido no selectivo.

Microdilución en caldo (pocillos): La aplicación del inóculo se debe realizar dentro de los 15 minutos posteriores a su ajuste. Cada pocillo se inocula utilizando algún dispositivo, por ejemplo, pipeta automática mono o multicanal.

El volumen de suspensión bacteriana agregado no debe exceder el 10 % del volumen total del pocillo (por ej. ≤ 10 µl de inóculo en 0,1 ml de la solución de antimicrobiano). Sí el volumen de inóculo agregado es de 0,05 ml (dentro del pocillo con 0,05 ml de las diluciones del antimicrobiano), se obtiene como resultado una dilución al medio de la solución de antimicrobiano y del inóculo como sucede en el método de macrodilución. Esto se debe tener en cuenta al preparar tanto el inóculo como el rango de diluciones; en ambos casos las concentraciones deberán duplicar la final deseada.

Al igual que para macrodilución, es aconsejable realizar un control de pureza del inóculo subcultivando una alícuota en un medio sólido no selectivo.

Al finalizar la prueba, se debe sellar cada policubeta con tapa plástica, película plástica autoadhesiva o en una bolsa de plástico para evitar la desecación.

El tiempo de incubación para la mayoría de los microorganismos es de 16 a 20 hs, tanto para la técnica de macro como de microdilución.

En el caso de *Haemophilus* spp., y *Streptococcus,* la prueba se debe incubar 20-24 horas.

Cuando se evalúa la sensibilidad de estafilococos y enterococos a oxacilina y vancomicina, respectivamente, se debe prolongar la incubación a 24 horas. Para mantener una temperatura de incubación uniforme, se recomienda no apilar más de cuatro policubetas.

> B5.4 Lectura e interpretación de resultados

La CIM es la menor concentración de antimicrobiano capaz de inhibir completamente el desarrollo bacteriano en el tubo o pocillo, el punto final queda definido a simple vista por la falta de turbidez del caldo. Alternativamente para la lectura y registro de resultados del método de microdilución se puede utilizar un dispositivo lector que pueda discernir entre desarrollo y ausencia del mismo.

Para determinar el punto final de desarrollo, debe compararse cada tubo o pocillo con el tubo o pocillo control de crecimiento. El ensayo se considera válido si en el pocillo control de crecimiento se observa un botón de crecimiento ≥ 2 mm de diámetro o turbidez neta.

Cuando se evalúa la sensibilidad a trimetoprima y sulfonamidas se puede observar un leve crecimiento como consecuencia de sustancias antagonistas del medio. En estos casos el punto final se define como la concentración en la cual hay una reducción en el crecimiento ≥ 80 % comparada con el control del crecimiento.

Cuando en una prueba de microdilución se obtiene un pocillo salteado, se debe leer la CIM más alta. Si apareciera más de un pocillo salteado con alguna droga, ésta no se debería informar.

Para bacilos gram negativos las CIMs obtenidas por el micrométodo tienden a ser las mismas o una dilución menor a las obtenidas por el macrométodo.

Al médico se le puede informar directamente el valor de la CIM pero es importante para que haya una buena comprensión del dato por parte de todos los médicos, que dicho valor se acompañe de la correcta categoría de interpretación.

Para la mayoría de los agentes antimicrobianos éstas categorías se desarrollaron determinando la CIM de un gran número de aislamientos, incluyendo aquellos con mecanismos de resistencia clínicamente relevantes para cada particular clase de drogas. Además se tuvieron en cuenta las pro-

piedades farmacocinéticas de la droga en las dosificaciones convencionales y por último se consideraron, cuando fue posible, los estudios de eficacia clínica en el tratamiento de patógenos específicos.

Para minimizar las posibles variaciones entre distintos observadores en la interpretación de los puntos finales de la CIM, dicha interpretación debe controlarse periódicamente.

Para esto, se debe seleccionar un grupo de pruebas de dilución y todo el personal del laboratorio que realice la prueba seleccionada, debe leer independientemente el resultado. Todos los valores deben ser registrados y comparados con el valor obtenido por un lector experimentado. Para ser aceptables las lecturas realizadas por los distintos observadores deben tener entre ellas, una variación menor que ≤ 1 dilución.

Figura 9. Método de macrodilución en caldo. La CIM corresponde a la primera concentración de ATB donde se observe inhibición del desarrollo (En la figura 16 µg/ml).

B6- Control de calidad

El objetivo del control de calidad es el de supervisar la exactitud y fiabilidad de la metodología. Para controlar la precisión y la exactitud del método de dilución, se cuenta con varias cepas control:

- *E. coli* ATCC® 25922, cepa no productora de ß-lactamasa. Se utiliza como control de calidad para Bacilos Gram Negativos no fastidiosos y *N. meningitidis*.
- *E. coli* ATCC® 35218, productora de ß-lactamasa (**no** ß-lactamasas de espectro extendido, BLEE) ha sido designada para el control de calidad de los discos que contengan la combinación "ß-lactámico+ in-

hibidor de ß-lactamasa", tales como aquellos conteniendo ácido clavulánico, sulbactama o tazobactama. Si se usa en conjunto con *E. coli* ATCC® 25922, pueden ser controlados los dos componentes de la combinación en el disco.

- *K. pneumoniae* ATCC® 700603, se usa como control en la determinación de ß-lactamasas de espectro extendido (BLEE).
- *P. aeruginosa* ATCC® 27853, contiene una ß-lactamasa AmpC C inducible.
- *S. aureus* ATCC® 29213, ß-lactamasa positiva, cepa meticilino sensible.
- *S. aureus* ATCC® 25923, ß-lactamasa negativa, cepa meticilino sensible. Útil para corroborar la estabilidad de los discos de oxacilina, en medio M-H no suplementado muestra un halo aceptable de 18-24 mm.
- *S. aureus* ATCC® 43300, cepa meticilino resistente (oxacilina resistente).
- *E. faecalis* ATCC® 29212, para control de timina-timidina del medio. También se utiliza para controlar los discos de alta carga de aminoglucósidos (gentamicina 120 µg o estreptomicina 300 µg). Se utiliza como control de calidad para Bacterias Gram positivas no fastidiosas.
- *E. faecalis* ATCC® 51299, cepa resistente a vancomicina y con alto nivel de resistencia a aminoglucósidos.
- *H. influenzae* ATCC® 49247, cepa ß-lactamasa negativa, resistente a ampicilina.
- *H. influenzae* ATCC® 49766, cepa sensible a ampicilina.
- *N. gonorrhoeae* ATCC® 49226, cepa con resistencia cromosómica a penicilina.
- *S. pneumoniae* ATCC® 49619, cepa con susceptibilidad intermedia a penicilina. Se utiliza como control de calidad para *S. pneumoniae*, *Streptococcus* spp., y *N. meningitidis.*

Los límites aceptables para las cepas de control de calidad utilizados para monitorear la CIM difieren según se haya realizado el ensayo con medio M-H sin o con el agregado de sangre, cationes u otros suplementos nutricionales, según se trate de microorganismos no fastidiosos o fastidiosos, según se haya utilizado el método de dilución en agar o dilución en caldo y según se haya utilizado caldo Brucella en lugar de M-H para la realización de la prueba.

La cepa de referencia ideal para control de calidad de los métodos de dilución debe tener una CIM cercana al centro del rango de las diluciones ensayadas para todos los antimicrobianos Por ej. una cepa de control de calidad ideal se debe inhibir en la cuarta de una serie de siete diluciones, pero debe considerarse aceptable si se inhibe en la tercera o la quinta dilución. Algunas veces, en particular cuando se prueban nuevos y más potentes antimicrobianos, puede ser necesario probar cepas de control de calidad adicionales para obtener valores dentro de la escala ensayada.

Cuando se prueban por este método tres o menos diluciones al medio de un antimicrobiano, se debe modificar el método de control de calidad.

Una alternativa es usar como control un microorganismo con una CIM modal para la droga que sea igual a la menor concentración probada, o no menor que una dilución al medio por debajo de la misma y otro con una CIM modal igual a la concentración más alta probada o no mayor que una dilución al medio por encima de dicha concentración. Para que el control de calidad sea aceptable, al menos una de las dos cepas debe estar dentro del rango ensayado.

Para los usuarios de sistemas comerciales esta estrategia se puede utilizar para probar selectivamente las drogas menos estables incluidas en los paneles [por ej.: meticilina, imipenem, cefaclor, combinaciones con ácido clavulánico, etc.].

Las cepas de control de calidad utilizadas para el método de dilución en medio sólido o líquido son prácticamente las mismas que se utilizan para el método de difusión por discos, sin embargo *S. aureus* ATCC 25923 es de poca utilidad en las pruebas de dilución por su alta sensibilidad a la mayoría de los antimicrobianos, por lo tanto se reemplaza por *S. aureus* ATCC 29213 que es una cepa débilmente productora de ß-lactamasa.

Los considerandos para la conservación de las cepas de control de calidad detallados en el método de difusión (página 601) son idénticos a los que se deben aplicar en el método de dilución.

Tabla 5. Problemas que pueden surgir en la determinación de la CIM de las cepas utilizadas como control de calidad.

Observación	Diagnóstico	Solución
CIM demasiado baja	1. Inóculo poco denso. 2. Inóculo con muchas células no viables. 3. Deterioro del medio de cultivo. 4. Deterioro del antibiótico 5. pH demasiado bajo o demasiado alto. 6. Contenido catiónico demasiado bajo o demasiado alto. 7. Pérdida espontánea de plásmidos 8. Lectura incorrecta de los resultados.	1. Comprobar y ajustar inóculo. 2. Utilizar un cultivo nuevo. 3. Utilizar nuevo lote. 4. Utilizar nuevo lote. 5. Comprobar pH del medio (rango aceptable 7,2-7,4) 6. Rango aceptable: Ca^{++} 20–25 mg/l Mg^{++} 10–12.5 mg/l 7. Utilizar una cepa nueva. 8. Repetir la lectura con varios observadores.
CIM demasiado alta	1. Inóculo muy denso. 2. Desarrollo de resistencia en la cepa control por repetidos subcultivos. 3. Deterioro del antibiótico 4. pH demasiado bajo o demasiado alto. 5. Contenido catiónico demasiado bajo o demasiado alto. 6. Si se ensayan carbapenemes, el contenido de Zn^{++} del medio es demasiado alto 7. Lectura incorrecta de los resultados	1. Comprobar y ajustar inóculo. 2. Utilizar una cepa nueva. 3. Utilizar nuevo lote. 4. Comprobar pH del medio (rango aceptable 7,2-7,4) 5. Rango aceptable: Ca^{++} 20–25 mg/l Mg^{++} 10–12.5 mg/l 6. Utilizar nuevo lote. 7. Repetir la lectura con varios observadores.
En microdilución se observan saltos en los pocillos	1. Contaminación 2. Inoculación impropia del panel o mezcla inadecuada del inóculo 3. Concentración de la droga en el pocillo inadecuada 4. Volumen del caldo en los pocillos inadecuado.	Repetir el ensayo

B7- Procedimiento con microorganismos fastidiosos

Haemophilus spp.: el método de elección para la determinación de la CIM para *Haemophilus influenzae* y *H. parainfluenzae* es el de dilución en caldo, utilizando caldo *Haemophilus* Test Medium (HTM).

El HTM contiene los siguientes ingredientes: caldo Mueller - Hinton, 15 µg/ml ß-NAD (ß-dinucleótido adenina-nicotiamida), 15 µg/ml de hematina bovina y 5 mg/ml de extracto de levadura (pH 7,2- 7,4).

Para hacer el HTM, prepare una solución stock fresca de hematina, disolviendo 50 mg en 100 ml de NaOH 0,01 N (0,01 mol / l) con calor y agitación hasta que el polvo esté totalmente disuelto. Treinta mililitros de la solución stock de hematina son agregados a 1 litro de M-H con 5 g de extracto de levadura. Después de autoclavar y enfriar, agregue 3 ml de una solución stock de NAD (50 mg de NAD disueltos en 10 ml de agua destilada, esterilizados por filtración).

Si se van a ensayar sulfonamidas o trimetoprima se debe agregar, asépticamente, al medio 0,2 UI/ml de timidita fosforilasa.

Para preparar el inóculo, realice una suspensión en caldo M-H o solución salina al 0,9 % a partir de una placa de agar chocolate incubada durante 20 - 24 horas. Ajuste a una turbidez equivalente al estándar 0,5 Mc Farland (1 - 4 X 10^8 UFC/ml).

La incubación de los tubos o microplacas se realiza por 20-24 hs en una atmósfera aeróbica a 35°C.

Neisseria gonorrhoeae: El método recomendado es el dilución en agar, utilizando agar GC con el agregado de 1% de suplemento de crecimiento (1,1 g L-cisteina; 0,03 g guanina HCL; 3 mg tiamina HCL, 13 mg PABA; 0,01 g B12; 0,1 g cocarboxilasa; 0,25 g NAD; 1 g adenina; 10 g L-glutamina; 100 g glucosa, 0,02 g nitrato férrico [en 1 l H_2O]), que se agrega luego del autoclavado. El uso de suplemento libre de cisteína se requiere para el método de dilución en agar cuando se evalúan carbapenemes y clavulánico.

La suspensión equivalente al 0,5 de McFarland para el inóculo se realiza directamente de las colonias La incubación se realiza atmósfera de 5% de CO_2 a 35ºC (no excederse de 37ºC) durante 20 a 24 hs.

Neisseria meningitidis: Los métodos recomendados son:

a. Microdilución en caldo, utilizando caldo M-H (con ajuste de cationes) suplementado con 2,5 a 5% v/v de sangre lisada de caballo.
b. Dilución en agar, utilizando agar M-H suplementado con 5% v/v de sangre de oveja desfibrinada.

La suspensión se realiza directamente de las colonias obtenidas de un cultivo en agar chocolate de 20-24 horas, en una concentración equivalente al 0,5 MF.

La suspensión puede realizarse a partir de colonias desarrolladas en agar sangre oveja, pero en este caso la concentración 0,5 MF podría contener aproximadamente un 50% menos de UFC/ml. Esto debería tenerse en cuenta cuando se prepare la dilución final. La incubación se realiza en atmósfera ambiente aeróbico o con CO_2 (excepto para azitromicina) a 35 ºC durante 20-24 hs.

Streptococcus pneumoniae: Los métodos recomendados son:

a. Dilución en caldo, utilizando caldo M-H (con ajuste de cationes) suplementado con 2,5 a 5% v/v de sangre lisada de caballo. La incubación se realiza en atmósfera aeróbica a 35 ºC durante 20-24 hs.
b. Dilución en agar, utilizando agar M-H suplementado con 5% v/v de sangre de oveja. Cuando se prueban sulfonamidas debe usarse sangre lisada de caballo. La incubación se realiza en atmósfera con CO_2 a 35 ºC durante 20-24 hs.

La suspensión se realiza directamente de las colonias, en una concentración equivalente al 0,5 MF.

Streptococcus spp. ß hemolíticos y *Streptococcus* grupo viridans: los métodos recomendados son:

Dilución en caldo, utilizando caldo M-H (con ajuste de cationes) suplementado con 2,5 a 5% v/v de sangre lisada de caballo. La suspensión se realiza directamente de las colonias, en una concentración equivalente al 0,5 MF. La incubación se realiza en atmósfera aeróbica a 35 ºC durante 20-24 hs.

Dilución en agar, utilizando agar M-H suplementado con 5% v/v de sangre de oveja. Cuando se prueban sulfonamidas debe usarse sangre lisada de caballo. La suspensión se realiza directamente de las colonias, en una concentración equivalente al 0,5 MF. La incubación se realiza en atmósfera con CO_2 a 35 ºC durante 20-24 hs.

C- metodo de determinacion de sensibilidad antimicrobiana por ensayo epsilométrico (E-test)

El principio de este método es una expansión de la técnica de difusión en disco. En el método E-test, mediante lectura directa, se puede determinar la CIM.

El E-test es un método de prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos técnicamente simple de realizar, como el método de difusión y que produce resultados semicuantitativos medidos en µg/ml.

Es específico por fármaco y consiste en una tira de plástico no poroso de 6 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones.

Para el ensayo se deben seguir las recomendaciones del fabricante, así como ciertas combinaciones antimicrobiano-bacterias que tienen requisitos de prueba especiales.

En general se procede igual que el método de difusión con discos siguiendo los pasos ya mencionados en esta guía.

Luego de la siembra del inóculo se debe dejar secar la placa 15 minutos, asegurándose que esté completamente seca antes de proceder. Mientras la placa se está secando, se retiran las tiras de E-test del congelador (-20ºC) y se dejan a temperatura ambiente.

Con un aplicador E-test o una pinza estéril, se colocan las tiras en la placa de agar inoculada seca, asegurándose que los valores impresos en la tira de la CIM estén colocados hacia arriba (la superficie de la tira que contiene el gradiente de antimicrobiano debe estar en contacto con el agar). Una vez colocadas, las tiras no deben moverse.

Luego de la incubación de las placas invertidas se habrá formado una elipse de crecimiento bacteriano en la placa alrededor de la tira y el E-test ya puede leerse.

La CIM se lee desde la intersección de la zona elíptica con el valor impreso en la tira de E-test. Usar luz oblicua para examinar cuidadosamente el punto del extremo final. Si es necesario usar una lupa.

Si el crecimiento tiene lugar a lo largo de toda la tira y no se observa formación de la elipse de inhibición, la CIM se informará como superior al valor máximo de la escala de lectura y, por el contrario, cuando la elipse de inhibición se encuentre por debajo de la tira debe ser informado como inferior al valor mínimo de la escala de lectura.

Tener en cuenta que:

a. Con ciertas combinaciones de bacterias-antimicrobiano, el extremo de la elipse de inhibición puede ser difuso.
b. Cuando la CIM coincide entre dos marcas de la tira se informará el resultado correspondiente al valor superior.
c. Para algunos microorganismos pueden aparecer colonias pequeñas en la zona de inhibición, por lo que se debe considerar como resistente.
d. Cuando se lea la intersección de la elipse con las tiras de sulfamidas, trimetoprima o trimetoprima/sulfametoxazol, se debe leer la intersección en la zona de crecimiento denso y no considerar la existencia de crecimiento en la zona poco densa.

Si se observan colonias grandes en la zona de inhibición puede representar un cultivo mixto o variantes resistentes. Se debe repetir el ensayo a partir de colonias del cultivo primario. Si se vuelve a observar el mismo patrón, se tienen que subcultivar las colonias que crecen en la zona de inhibición, identificarlas y volver a realizar la prueba. Si el mismo resultado y el cultivo es puro, se debe informar como resistente.

Los puntos de corte para la interpretación de la CIM siguen las recomendaciones del documento del CLSI (edición actualizada), con las excepciones hechas por el fabricante en el instructivo.

El E-test se considera como un método alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana del que cabe destacar su sencillez y buena correlación con la técnica estándar de dilución en agar para el estudio de la CIM. Como desventajas se encuentran que es un método costoso y no permite determinar la Concentración Bactericida mínima (CBM).

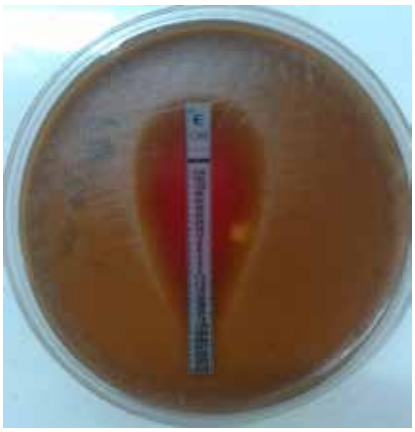


Figura 10. Ensayo de E-test de clindamicina frente a S. pneumoniae ATCC 49619.

D- metodos especiales para la determinacion de sensibilidad antimicrobiana

Existen métodos especiales que permiten determinar la capacidad bactericida de los antimicrobianos. Estos métodos se utilizan en determinadas circunstancias clínicas o en investigación.

Se utilizan para el estudio de antimicrobianos bactericidas en infecciones graves como meningitis, osteomielitis y endocarditis, en infecciones en inmunocomprometidos en especial la sepsis del neutropénico, en infecciones crónicas, en las exacerbaciones pulmonares agudas en la fibrosis quística y para determinar fenómenos de tolerancia en infecciones por cocos gram positivos que no responden al tratamiento antimicrobiano.

Desde el punto de vista clínico, esta dificultad de obtener un efecto bactericida está relacionada con una lenta respuesta al tratamiento, particularmente en las endocarditis estafilocócicas.

Entre las limitaciones de estos métodos se encuentra el no contar todos ellos con normas estandarizadas, tener baja reproducibilidad y ser afectados por las mismas variables mencionadas en los métodos de dilución (ver página 632).

Para cualquiera de los métodos se debe partir de un inóculo en fase logarítmica de crecimiento ya que algunos antimicrobianos, como los ß-lactámicos, solo son bactericidas en dicha fase.

D1- Concentración bactericida mínima (CBM)

Se refiere a la concentración de antimicrobiano necesaria para producir, en un período de tiempo predeterminado, una disminución del tamaño original del inoculo bacteriano (previamente estandarizado) en un porcentaje mayor o igual al 99,9%. Su objetivo es determinar la menor concentración de un antimicrobiano capaz de matar una cepa bacteriana y no solo inhibirla como en la CIM.

La CBM y la CIM son los parámetros farmacodinámicos más importantes utilizados para caracterizar la actividad de una droga en el laboratorio clínico. El objetivo de determinar la CBM es conocer cuanto más se debe aumentar la dosis de una droga en suero o en el sitio de infección durante parte o todo el tratamiento antimicrobiano a fin de obtener un efecto bactericida.

Para calcular la CBM se emplea el mismo método de dilución en medio líquido utilizado para realizar la CIM.

Al realizar la CIM, luego de sembrar el inóculo en los tubos de caldo con antimicrobiano, se toma una alícuota con ansa de recuento o micropipeta (100 µl según normas del CLSI documento M26-A, 1999 o 10 µl según otros autores) del tubo de control de crecimiento (tubo sin antimicrobiano) y se inocula una placa de agar (con el medio de cultivo que corresponda según el microorganismo en estudio) para determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC)/ml de ese inóculo inicial. Este número se obtiene contando las colonias que desarrollen, luego de la incubación en las condiciones adecuadas según el microrganismo en estudio, y multiplicando por el factor de dilución que corresponda.

Una vez determinada la CIM, se trabaja con los tubos que no presente turbidez o sea donde no se observe desarrollo bacteriano. Para ello de cada tubo y luego de agitación con vortex, se transfiere una alícuota, con ansa de recuento o micropipeta y se inocula una placa de agar (con el medio de cultivo que corresponda según el microorganismo en estudio).

La distribución del inóculo en la placa permite que se diluya la concentración del antimicrobiano presente en el caldo y neutraliza su efecto, además de permitir el recuento.

Las placas se incuban en las condiciones adecuadas según el microrganismo en estudio durante 18-24 hs y, multiplicando por el factor de dilución que corresponda, se obtiene para cada una las UFC/ml presentes.

Estos valores se comparan con el número de UFC/ml del cultivo original y se asigna como CBM a aquella donde se observe que solo han sobrevivido menos del 0,1% del inóculo original.

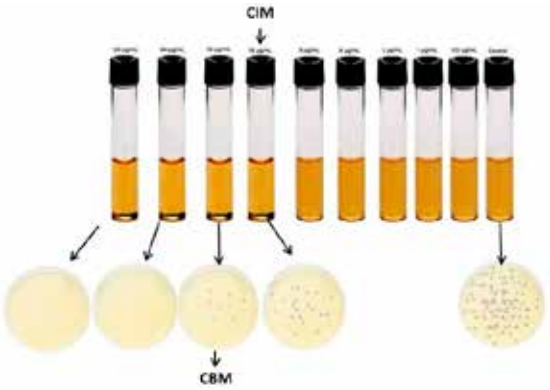


Figura 11. Pruebas de CIM y CBM.

También se puede determinar la CBM empleando el método de microdilución. Es importante en este caso homogeneizar bien el contenido de los pocillos (con agitador, micropipeta o manualmente).

En general, la CIM y la CBM en los antimicrobianos bactericidas tiene valores muy próximos pudiendo diferir en una o dos diluciones. En cambio, en drogas bacteriostáticas la CBM es varias veces más alta que la CIM.

Algunos antimicrobianos considerados bacteriostáticos pueden exhibir, a altas concentraciones, actividad bactericida contra algunos organismos susceptibles sobre la base de la determinación *in vitro* de los valores de CBM/CIM. Por ejemplo, los macrólidos son agentes bacteriostáticos clásicos, pero pueden demostrar actividad bactericida *in vitro* contra *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*. De igual manera, los antimicrobianos bactericidas, a bajas concentraciones o si el inóculo es muy elevado, pueden exhibir sólo actividad bacteriostática *in vitro*.

Existen además tres fenómenos que pueden aparecer al relacionar la CIM y la CBM:

- **Fenómeno paradójico o de Eagle:** es cuando la cantidad de bacterias supervivientes aumenta significativamente a medida que la concentra-

ción del antimicrobiano aumenta por encima de la CBM. Este efecto es particularmente común con agentes activos contra la pared bacteriana como los ß-lactámicos, y también se ha descripto con los aminoglucósidos y las quinolonas en bacterias gram negativas.

- **Tolerancia**: es la capacidad de los microorganismos de evadir el efecto letal de un agente antimicrobiano que normalmente es bactericida, sin modificar la actividad inhibitoria. La tolerancia se define cuando la CMI y la CMB están separadas por al menos 5 diluciones dobles o cuando la relación CMB/CMI >32. La tolerancia es especialmente común con los agentes activos contra la pared celular, como los ß-lactámicos. *In vitro*, la tolerancia ha sido demostrada en cepas que son defectuosas o carecen de enzimas autolíticas, aunque también puede presentarse una tolerancia fenotípica en células privadas de nutrientes que se multiplican muy lentamente o que no se multiplican. En algunas situaciones clínicas puede determinar la necesidad de asociar antimicrobianos.
- **Persistencia:** refleja el hecho de que una pequeña parte de la población bacteriana resiste a la acción bactericida. Aparece sobre todo con ß-lactámicos.

D2- Poder bactericida del suero (PBS) y Poder inhibitorio del suero (PIS)

Ambos métodos, PIS y PBS permiten valor *in vitro* la interrelación entre el antimicrobiano, el microorganismo y el paciente. Estudian la actividad inhibitoria (PIS) o bactericida (PBS) frente al microorganismo involucrado en el proceso infeccioso de un agente antimicrobiano presente en el suero del paciente. La utilidad clínica de estos ensayos proviene de informes relacionados con endocarditis bacteriana.

El objetivo del PIS es determinar la mayor dilución (o título) de un suero tomado de un paciente que se encuentra recibiendo tratamiento antimicrobiano que inhibe en forma visible el desarrollo microbiano (de la cepa responsable del proceso infeccioso) luego de incubación (usualmente 18-24 hs).

El objetivo del PBS es determinar la mayor dilución (título) de una muestra de suero tomada de un paciente que se encuentra recibiendo tratamiento antimicrobiano donde se produzca una reducción de la menos 3

$\log_{10}$ del número de células bacterianas supervivientes (comparado con el inóculo inicial) luego de incubación (usualmente 18 a 24 hs)-

Su mayor utilidad es que permite monitorear la terapia antimicrobiana. Sus limitaciones provienen de la falta de normas estandarizadas y de los mismos factores que pueden afectar las técnicas de CIM y CBM.

Para realizar la técnica se debe contar con dos muestras del suero del paciente, una tomada cuando es máxima la concentración de antimicrobiano (pico) y otra cuando esta concentración es mínima (valle), lo cual va a depender de la farmacocinética del antimicrobiano y de la vía de administración.

En general, la primera toma (en pico) se realiza 30-45 minutos después de la administración de la droga por vía endovenosa o 90 minutos de la administración por vía intramuscular o 90 minutos de la administración por vía oral. La toma en valle se realiza inmediatamente antes de la administración de una nueva dosis del antimicrobiano en estudio. Si el suero obtenido no se utiliza inmediatamente puede ser congelado a -20ºC.

Además, se debe contar con la cepa aislada del paciente y responsable de la infección.

Al igual que para realizar la CIM, se puede utilizar la técnica de macrodilución o de microdilución. El método se debe realizar con ambas muestras de suero, en el pico y en el valle.

Macrodilución en caldo:

- Preparar una batería de tubos con 1 ml de caldo M-H (generalmente se usan 6 tubos).
- Añadir 1 ml de suero al primer tubo.
- Añadir 1 ml de suero al segundo tubo y mezclar con vortex.
- Transferir 1 ml del segundo tubo al tercer tubo, mezclar y repetir la operación con los siguientes tubos.
- Añadir 1 ml de caldo M-H a cada uno de los tubos, en los que se ha diluido el suero (o sea del segundo tubo en adelante) para que todos tengan un volumen final de 2 ml.
- Preparar 2 tubos adicionales con 2ml de caldo M-H, uno de ellos servirá como control de crecimiento de la cepa involucrada y el otro como control de esterilidad.
- Preparar con la cepa aislada del paciente (en fase logarítmica de desarrollo), un inóculo ajustado al 0,5 de la escala de McFarland. (Es conveniente verificar el inóculo mediante siembra en medio sólido y recuento).

- Añadir 100 µl del inóculo a cada uno de los tubos, excepto en aquel que servirá como control de esterilidad.
- Incubar los tubos 24 hs a 35ºC.

El valor del PIS está determinado por la mayor dilución (o título) que inhibe en forma visible el desarrollo microbiano.

Luego de determinado dicho valor, se toma una alícuota de 100 µl de cada tubo y se inocula una placa de agar (con el medio de cultivo que corresponda según el microorganismo en estudio), las que se incuban en las condiciones adecuadas según el microrganismo en estudio durante 18-24 hs.

El valor del PBS se obtiene de la primera placa donde no se observe desarrollo microbiano (mayor dilución de un antimicrobiano en el suero del paciente, capaz de matar al inóculo en un 99,9 %).

Microdilución en caldo:

La diferencia con la macrodilución es que se emplean placas de microtitulación, debe realizarse por duplicado y las placas deben cubrirse para evitar la evaporación

Se hacen diluciones progresivas del suero en caldo M-H de tal forma que en cada pocillo se obtenga una relación 1:1 (suero diluido y caldo M-H).

- Agregar en cada pocillo 50 µl de caldo M-H.
- Añadir 50 µl de suero al primer pocillo.
- Añadir 50 µl de suero al segundo pocillo y mezclar con micropipeta.
- Transferir 50 µl del segundo pocillo al tercer pocillo, mezclar y repetir la operación con los siguientes pocillos.
- Añadir 50 µl de caldo M-H a cada uno de los pocillos en los que se ha diluido el suero (o sea desde el segundo pocillo en adelante) para que todos tengan un volumen final de 100 µl.

El inóculo se prepara de igual manera que para el método de macrodilución y se agrega a cada pocillo la cantidad necesaria (50 µl) como para obtener una dilución 1:2 del microorganismo.

- Incubar las placas 24 hs a 35ºC cubriéndolas para evitar la evaporación.

El valor del PIS está determinado por la mayor dilución (o título) que inhibe en forma visible el desarrollo microbiano.

Luego de determinado dicho valor, se toma una alícuota de 10 µl de cada pocillo y se inocula una placa de agar (con el medio de cultivo que

corresponda según el microorganismo en estudio), las que se incuban en las condiciones adecuadas según el microrganismo en estudio durante 18-24 hs.

El valor del PBS se obtiene de la primera placa donde no se observe desarrollo microbiano (mayor dilución de un antimicrobiano en el suero del paciente, capaz de matar al inóculo en un 99,9 %).

Aunque no existe consenso en la interpretación de los resultados, cualquier sea el método utilizado (macro o microdilución) se considera que títulos en el pico ≥1:32 y en el valle ≥1:8 indican un poder bactericida adecuado. Sin embargo, se han informado tratamientos exitosos de endocarditis con títulos de PBS ≥1:2 y ≥1:4. Un título ≤ 1:2 se considera un PBS inadecuado.

En resumen, el uso del PBS en la endocarditis infecciosa no puede predecir el éxito o la falla de un tratamiento antimicrobiano, pero sí es clínicamente útil para documentar las concentraciones terapéuticas de las drogas en suero y demostrar que el régimen es bactericida.

E- Metodos fenotipicos para la deteccion de mecanismos de resistencia

Tener en cuenta que, algunos aislamientos inicialmente susceptibles pueden volverse resistentes o con susceptibilidad intermedia durante el tratamiento antimicrobiano. Por lo tanto, de repetirse el aislamiento de una misma especie bacteriana de un sitio similar del organismo en un paciente, se debe reiterar el estudio de susceptibilidad a fin de detectar la aparición de resistencia. Esta situación puede ocurrir en apenas 3 a 4 días, por ejemplo con aislamientos de *Enterobacter*, *Citrobacter y Serratia* frente a cefalosporinas de 3º generación, de *Pseudomonas* frente a todos los antimicrobianos, y en estafilococos frente a quinolonas. Incluso cepas de *S. aureus* sensibles a vancomicina pueden presentar susceptibilidad intermedia durante un tratamiento prolongado con dicho antimicrobiano.

Además, para la elección de los antimicrobianos a ensayar es necesario conocer que algunos microorganismos tienen resistencia intrínseca a determinadas drogas mientras que otros pueden adquirir resistencia a las mismas.

La resistencia intrínseca se define como la resistencia inherente o innata a agentes antimicrobianos que presentan todas o la mayoría de los representantes de una especie bacteriana. Conocer la resistencia intrínseca

permite no realizar estudios de sensibilidad innecesarios, colaborar en la identificación bacteriana, evaluar que se hayan cumplido correctamente las normas estandarizadas de los ensayos de susceptibilidad y verificar sus resultados. Por ejemplo, las especies de *Citrobacter* son intrínsecamente resistentes a ampicilina. Si al realizar el ensayo de susceptibilidad, la cepa involucrada es sensible a ampicilina o no es *Citrobacter* o algún paso de la técnica no ha sido realizado correctamente.

La Tabla 6 muestra la resistencia intrínseca de algunos microrganismos de aislamiento frecuente en el laboratorio clínico y ha sido adaptada del documento M100-S25 del CLSI 2015.

La resistencia adquirida es variable y es adquirida por una cepa de una especie bacteriana. Puede deberse a una mutación cromosómica o a la adquisición de genes de resistencia a través de plásmidos, transposones o integrones que pueden ser transferidos entre células bacterianas de una misma especie o especies diferentes, convirtiéndola en un fenómeno transferible.

Los procedimientos que se detallan a continuación son aquellos que han sido estandarizados por el CLSI y figuran en el documento M100-S25 del CLSI 2015.

Tabla 6. Resistencia intrínseca a antimicrobianos de microorganismos de aislamiento frecuente en el laboratorio clínico.

Enterobacterias													
	Antimicrobiano												
Organismo	Ampicilina	Amoxicilina-clavulánico	Ampicilina-sulbactama	Piperacilina	Ticarcilina	Cefazolina, Cefalotina	Cefoxitina, Cefotetan	Cefuroxima	Imipenem	Tigeciclina	Nitrofurantoína	Polimixina B, Nitrofurantoína	Aminoglucósidos
Citrobacter freundii	R	R	R			R	R	R					
Citrobacter koseri				R	R								
Enterobacter aerogenes	R	R	R			R	R	R					
Enterobacter cloacae	R	R	R			R	R	R					
Escherichia hermanii	R				*r*								
Klebsiella pneumoniae	R				R								
Morganella morganii	R	R				R		R	*	R	R	R	
Proteus mirabilis									*	R	R	R	
Proteus penneri	R					R		R	*	R	R	R	
Proteus vulgaris	R					R		R	*	R	R	R	
Providencia rettgeri	R	R				R			*	R	R	R	
Providencia stuartii	R	R				R				R	R	R	**
Serratia marcescens	R	R	R			R	R	R			R	R	

* *Proteus* spp., *Providencia* spp., y *Morganella* spp., pueden tener CIM a imipenem elevadas por mecanismos distintos a la producción de carbapenemasas.

** *Providencia stuartii* debe ser considerada resistente a gentamicina, netilmicina y tobramicina pero no es intrínsecamente resiste a amicacina.

Todas las enterobacterias son también intrínsecamente resistente a clindamicina, daptomicina, ácido fusídico, glicopéptidos (vancomicina, teicoplanina), linezolid, macrólidos (con algunas excepciones) (eritromicina, claritromicina, azitromicina), quinupristin-dalfopristin y rifampicina.

Recordar que en *Salmonella* spp., y *Shigella* spp., las cefalosporinas de primera y segunda generación y las cefamicinas pueden parecer activas in vitro pero no son efectivas clínicamente por lo que no hay que informarlas como susceptible.

Tabla 6 (continuación). Resistencia intrínseca a antimicrobianos de microorganismos de aislamiento frecuente en el laboratorio clínico.

NO Enterobacterias

Organismo	Antimicrobiano																		
	Ampicilina, Amoxicilina	Piperacilina	Ticarcilina	Ampicilina-sulbactama	Amoxicilina-clavulánico	Piperacilina-tazobactama	Cefotaxima, ceftriaxona	Cefepima	Aztreonam	Imipenem	Meropenem	Ertapenem	Polimixina B, colistina	Aminoglucósidos	Tetraciclinas, tigeciclina	Trimetoprima	Trimetoprima-sulfametoxazol	Cloramfenicol	Fosfomicina
Acinetobacter baumannii / complejo A. calcoaceticus	R				R				R			R				R			R
Complejo *Burkolderia cepacia*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R	R		R			R
Pseudomonas aeruginosa	R			R	R		R					R			R	R	R	R	R
Stenotrophomonas maltophilia	R	R	R	R	R	R	R		R	R	R	R		R	*	R			R

Acinetobacter baumannii/calcoaceticus son susceptibles a ampicilina-sulbactam por la actividad del sulbactam sobre estas especies

* *Stenotrophomonas maltophilia* es intrínsecamente resistente a tetraciclina pero no a doxiciclina, minociclina o tigeciclina.

Estas bacterias gran negativas no fermentadoras son también intrínsecamente resistentes a aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina), cefalosporinas de 1° generación (cefalotina, cefazolina), cefalosporinas de 2° generación (cefuroxima), cefamicinas (cefoxitina, cefotetan), clindamicina, daptomicina, ácido fusídico, glicopéptidos (vancomicina, teicoplanina), linezolid, macrólidos (eritromicina, claritromicina, azitromicina), penicilinas (ej. benzilpenicilina) quinupristin-dalfopristin y rifampicina.

Tabla 6 (continuación). Resistencia intrínseca a antimicrobianos de microorganismos de aislamiento frecuente en el laboratorio clínico.

Estafilococos

Organismo	Antimicrobiano		
	Novobiocina	Fosfomicina	Ac. fusídico
S. aureus / *S. lugdunensis*			
S. epidermidis	No existe resistencia intrínseca para estos antimicrobianos en estas especies		
S. haemolyticus			
S. saprophyticus	R	R	R
S. capitis		R	
S. cohnii	R		
S. xylosus	R		

Los estafilococos son también intrínsecamente resistentes a aztreonam, polimixina B, colistín y ácido nalidíxico.

S. aureus y *Staphylococcus* coagulasa negativos oxacilino resistentes (meticilino resistentes) son resistentes a otros ß-lactámicos: penicilinas, combinaciones de penicilinas+ inhibidores de ß-lactamasas, cefemes (excepto las cefalosporinas con actividad sobre cepas meticilino resistentes) y carbapenemes.

Enterococos

Organismo	Antimicrobiano								
	Cefalosporinas	Vancomicina	Teicoplanina	Aminoglucósidos	Clindamicina	Quinupristin-dalfopristin	Trimetoprima	Trimetoprima-sulfametoxazol	Ácido fusídico
Enterococcus faecalis	R*			R*	R*	R	R	R*	R
Enterococcus faecium	R*			R*	R*		R	R*	R
E. gallinarum / *E. casseliflavus*	R*	R		R*	R*	R	R	R*	R

En *Enterococcus* spp., las cefalosporinas, los aminoglucósidos (excepto para *screening* de alto nivel de resistencia con alta carga), clindamicina, y trimetoprima-sulfametoxazol pueden aparecer susceptibles in vitro pero no son efectivos clínicamente por lo que no debe informarse como sensibles.

Los enterococos son también intrínsecamente resistentes a aztreonam, polimixina B, colistín y ácido nalidíxico.

E1- Bacilos gram negativos no fastidiosos

> E1a- Detección de ß-Iactamasas de espectro extendido (BLEE) en enterobacterias

La resistencia a ß-lactámicos puede ocurrir básicamente por cuatro mecanismos: impermeabilidad, alteración de las PBP (enzimas que participan en la formación de la pared celular bacteriana), eflujo y/o producción de ß-lactamasas.

Entre los números tipos de ß-lactamasas, las BLEE (ß-lactamasas de espectro extendido) son mutantes derivadas de las antiguas ß-lactamasas de espectro ampliado (TEM-1, TEM-2, SHV-1) que han extendido su perfil de sustrato posibilitando la hidrólisis de todas las cefalosporinas de 1º, 2º y 3º generación, penicilinas y aztreonam, pero no de los carbapenemes ni las cefamicinas (cefoxitina, cefotetan) y son inhibidas por ácido clavulánico. La mayoría de ellas, además hidrolizan las cefalosporinas de 4º generación (cefepima).

Los microorganismos que expresan BLEE son frecuentemente resistentes a otros agentes antimicrobianos debido a que generalmente se ha detectado estrecha relación entre la producción de BLEE y la resistencia asociada a varios de ellos. Típicamente, los genes que codifican la producción de BLEE se encuentran localizados en plásmidos y en general no necesitan la presencia de un ß-lactámico para que se expresen. Frecuentemente, en los plásmidos que contienen los genes que las codifican se encuentran otros genes codificantes de resistencia a antimicrobianos no-ß-lactámicos (quinolonas y aminoglucósidos), otorgando a estas cepas un fenotipo de multi-resistencia.

Estas enzimas son mayormente producidas por *Klebsiella* spp., y *E. coli*, pero han sido descriptas también en otras bacterias gram negativas: *Enterobacter, Salmonella, Shigella, Proteus, Serratia, Morganella, Citrobacter, M. morganii, P. aeruginosa*, entre otras.

Actualmente, se conocen más de 200 BLEE. Las que pertenecen a la familia TEM, generalmente son más activas sobre ceftazidima que sobre la cefotaxima. Mientras que las del tipo SHV tienen igual actividad tanto frente a cefotaxima como a ceftazidima.

Las primeras prevalecen en Estados Unidos y Europa, y las segundas son de distribución universal.

Un tercer tipo de BLEE son las denominadas CTX-M, las cuales tienen mayor actividad sobre cefotaxima y ceftriaxona.

En 1989 surgió en Argentina un brote por *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. A partir de estos aislamientos se identificó por primera vez la producción de CTX-M-2. Desde que fue detectada CTX-M-2 representa la BLEE prevalente en los aislamientos de *Enterobacteriaceae* en Argentina.

En *P. aeruginosa,* la producción de BLEE es menos frecuente. Entre ellas, PER-1, PER-2 (identificada en Argentina en 1994), VEB-1 y VEB-2, GES-1, GES-2 e IBC-2, aunque en los últimos años han sido descriptas BLEE tipo CTX-M en este microorganismo.

Los ensayos fenotípicos y confirmatorios de la producción de BLEE estandarizados por el CLSI 2015, tanto por el método de difusión con discos como el de dilución en caldo, hacen referencia a *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* y *P. mirabilis.* (Tabla 7).

La decisión de realizar la búsqueda de BLEE en aislamientos urinarios debería hacerse por decisión institucional, considerando prevalencia, terapia y controles de infección.

Para *P. mirabilis* se sugiere solo estudiar la presencia de BLEE en aislamientos clínicamente relevantes (por ejemplo aislamiento en bacteriemias).

Para otras enterobacterias, SADEBAC propone considerar como sospechosas de BLEE a aquellas cepas que presenten halos de inhibición a cefotaxima (30 µg) ≤ 26 mm.

Es importante tener en cuenta que el uso de más de un agente antimicrobiano para el *screening* aumenta la sensibilidad de la detección.

En los ensayos confirmatorios se debe ensayar ambos antimicrobianos: cefotaxima y ceftazidima; solos y en combinación con ácido clavulánico.

Para el control de calidad del método se utiliza las cepas *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *E. coli* ATCC 25922.

Tabla 7. Ensayos de screening y confirmatorios para BLEE en *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* y *P. mirabilis* (adaptado de CLSI, M100-S25, 2015).

	Ensayos de Screening		Ensayos Confirmatorios	
	Método de difusión	Método de dilución (CIM)	Método de difusión	Método de dilución (CIM)
Medio	Agar Mueller-Hinton	Caldo Mueller-Hinton	Agar Mueller-Hinton	Caldo Mueller-Hinton
Concentración de antimicrobianos	Para *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *E. coli*: Cefpodoxima 10 µg ó Ceftazidima 30 µg ó Aztreonam 30 µg ó Cefotaxima 30 µg ó Ceftriaxona 30 µg Para *P. mirabilis* Cefpodoxima 10 µg ó Ceftazidima 30 µg ó Cefotaxima 30 µg	Para *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *E. coli*: Cefpodoxima 4 µg/ml ó Ceftazidima 1 µg/ml ó Aztreonam 1 µg/ml ó Cefotaxima 1 µg/ml ó Ceftriaxona 1 µg/ml Para *P. mirabilis* Cefpodoxima 1 µg/ml ó Ceftazidima 1 µg/ml ó Cefotaxima 1 µg/ml	Ceftazidima 30 µg Ceftazidima-ácido clavulánico 30/10 µg y Cefotaxima 30 µg Cefotaxima-ácido clavulánico 30/10 µg	Ceftazidima 0,25-128 µg/ml Ceftazidima-ácido clavulánico 0,25/4-128/4 µg/ml y Cefotaxima 0,25-64 µg/ml Cefotaxima-ácido clavulánico 0,25/4-64/4 µg/ml
Inóculo	Recomendaciones estándar del método de difusión con discos	Recomendaciones estándar del método de dilución en caldo	Recomendaciones estándar del método de difusión con discos	Recomendaciones estándar del método de dilución en caldo
Condiciones de incubación	35ºC, aeróbicamente	35ºC, aeróbicamente	35ºC, aeróbicamente	35ºC, aeróbicamente
Tiempo de incubación	16–18 hs	16-20 hs	16–18 hs	16-20 hs

Resultados	Para *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *E. coli*: Cefpodoxima ≤ 17mm Ceftazidima ≤ 22mm Aztreonam ≤ 27mm Cefotaxima ≤ 27mm Ceftriaxona ≤ 25mm Para *P. mirabilis* Cefpodoxima ≤ 22mm Ceftazidima ≤ 22mm Cefotaxima ≤ 27mm = podría indicar producción de BLEE	Para *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *E. coli* una CIM ≥ 8 µg/ml para cefpodoxima o CIM ≥ 2 µg/ml para ceftazidima, aztreonam, cefotaxima o ceftriaxona; Para *P. mirabilis* CIM ≥ 2 µg/ml para cefpodoxima, ceftazidima y cefotaxima podría indicar producción de BLEE	Un incremento 3 de 5 mm del diámetro de la zona de inhibición cada uno de los agentes ensayados en combinación con ácido clavulánico versus la zona de inhibición cuando se ensaya solo = producción de BLEE (ej. halo de ceftazidima = 16 mm; ceftazidima-ácido clavulánico = 21)	Una disminución ≥ a 3 diluciones en la CIM de cada uno de los agentes ensayados en combinación con ácido clavulánico versus la CIM cuando se ensaya solo = producción de BLEE (ej. ceftazidima CIM= 8 µg/ml; ceftazidima-ácido clavulánico CIM = 1 µg/ml)

Para el control de calidad, los halos de inhibición/ CIM de las cepas patrones frente a los antimicrobianos en los ensayos de *screening* y confirmatorios son:

Antimicrobiano (ensayo de ***screening***)	***K. pneumoniae*** ATCC 700603	
	Halos de inhibición	**CIM**
Cefpodoxima	9-16 mm	≥ 8 µg/ml
Ceftazidima	10-18 mm	≥ 2 µg/ml
Aztreonam	9-17 mm	≥ 2 µg/ml
Cefotaxima	17-25 mm	≥ 2 µg/ml
Ceftriaxona	16-24 mm	≥ 2 µg/ml
Antimicrobiano (ensayo de *screening*)	E. coli ATCC 25922	
	Halos de inhibición	CIM
Cefpodoxima	23–28 mm	Sin desarrollo (rango aceptable 0,25–1 µg/ml)
Ceftazidima	25-32 mm	Sin desarrollo (rango aceptable 0,06–0,5 µg/ml)
Aztreonam	28-36 mm	Sin desarrollo (rango aceptable 0,06–0,25 µg/ml)
Cefotaxima	29-35 mm	Sin desarrollo (rango aceptable 0,03–0,12 µg/ml)
Ceftriaxona	29-35 mm	Sin desarrollo (rango aceptable 0,03–0,12 µg/ml)

Antimicrobiano (ensayo confirmatorio)	*K. pneumoniae* ATCC 700603	
	Halos de inhibición	CIM
Cefotaxima versus cefotaxima clavulánico	Incremento ³ de 3 mm de incremento en el diámetro del halo de cefotaxima clavulánico versus el diámetro del halo de cefotaxima sola	Una disminución ³ a 3 diluciones en la CIM de cada uno de los agentes ensayados en combinación con ácido clavulánico versus la CIM cuando se ensaya solo
Ceftazidima Versus ceftazidima clavulánico	Incremento de ³ 5 mm en el diámetro del halo de ceftazidima clavulánico versus el diámetro del halo de ceftazidima sola	
Antimicrobiano (ensayo confirmatorio)	*E. coli* ATCC 25922	
	Halos de inhibición	CIM
Cefotaxima versus cefotaxima clavulánico	Incremento del halo de inhibición £ 2 mm para cada antimicrobiano ensayado solo versus el halo cuando se ensaya en combinación con ácido clavulánico	Una disminución de < 3 diluciones en la CIM de un antimicrobiano ensayado en combinación con ácido clavulánico versus la CIM cuando se ensaya solo
Ceftazidima versus ceftazidima clavulánico		

El ensayo conocido como test de Jarlier, es otro método fenotípico que permiten sospechar la existencia de cepas productoras de BLEE al realizar el antibiograma y puede ser implementado de rutina simplemente colocando estratégicamente los discos o tabletas.

Este test también se basa en la capacidad del ácido clavulánico de inhibir la mayoría de las BLEE (superior a sulbactama o tazobactama, por lo que no se recomienda su uso). por lo tanto si al realizar el antibiograma habitual se coloca al lado de un disco de cefotaxima (y/o ceftazidima un disco que contenga ácido clavulánico (amoxicilina/clavulánico, ticarcilina/clavulánico) y, luego de la incubación, se observa que hay un aumento del halo de inhibición (sinergismo) de cefotaxima y/o ceftazidima (o la formación de un "huevo" o "pelota de rugby") en la zona cercana a donde se colocó el disco con clavulánico, se podría sospechar que se está en presencia de una cepa productora de BLEE (Figura 12) . De ser así, se hace necesario realizar los ensayos estandarizados descriptos previamente (Figura 13).

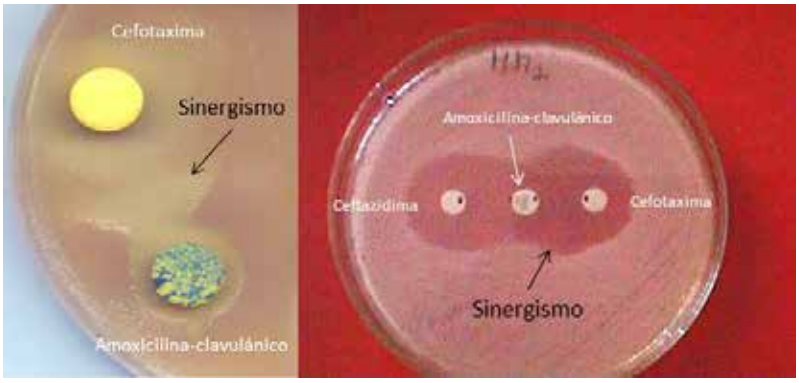


Figura 12. Test de Jarlier positivo. Ensayos realizados con tabletas (placa izquierda) y con discos de papel (placa derecha).

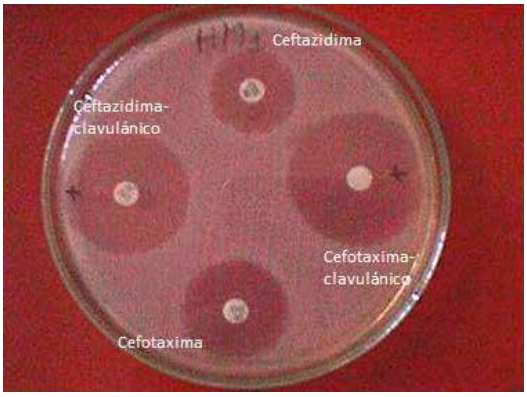


Figura 13. Ensayo fenotípico de screening. Cepa probable productora de BLEE. Observe el aumento de los halos de inhibición de los antimicrobianos solos en comparación con los antimicrobianos + ácido clavulánico.

> E1b- Ensayos para la detección de cepas sospechosas de producir carbapenemasas

Entre los β- lactámicos, los carbapenemes (imipenem, meropenem, ertapenem, diapenem, entre otros) son antibióticos de amplio espectro de actividad y se caracterizan por su estabilidad frente a la hidrólisis de la mayoría de las β-lactamasas.

Las carbapenemasas son un grupo diverso de enzimas capaces de hidrolizar no solo las cefalosporinas de 3º y 4º generación y las cefamicinas (cefoxitina, cefotetan) sino también los carbapenemes.

Las carbapenemasas son el grupo más diverso de enzimas. Las más difundidas pertenecen a dos clases: las carbapenemasas clase A que son menos activas frente a carbapenemes e inhibidas por los inhibidores de β-lactamasas clínicamente útiles, como sulbactama, ácido clavulánico o tazobactama y las clase B, también conocidas como metalo-ß-lactamasas (MBL), más activas sobre los carbapenemes, y que no son inhibidas por inhibidores de ß-lactamasas.

Otras carbapenemasas pertenecen a la clase C y D pero tienen una actividad marginal sobre los carbapenemes y probablemente requieran la presencia de otros mecanismos de resistencia, como impermeabilidad, para observar una verdadera resistencia a dichos antimicrobianos. La producción de carbapenemasas clase D son la principal causa de resistencia a carbapenemes en *Acinetobacter* spp.

Las carbapenemasas clase A, a excepción de las de tipo KPC, hidrolizan eficientemente imipenem y meropenem, penicilinas, cefalosporinas de primera generación y aztreonam, pero no cefalosporinas de 3º generación.

Las carbapenemasas de clase A se codifican, algunas cromosómicamente como en *Serratia* denominada SME, y otras en plásmidos como son las variantes de tipo Guyana y las del tipo KPC. Otras enzimas relacionadas son las de los grupos IMI (IMI-1 y -2) y NMC-A encontradas inicialmente en diferentes especies del género *Enterobacter*, y variantes de las BLEE de tipo GES presentes en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., y enterobacterias.

Dentro de las carbapenemasas de clase A, las que mayor importancia epidemiológica tienen son las denominas KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa).

Las MBL son enzimas que requieren un ion divalente, usualmente Zn2+, para su actividad catalítica. Son resistentes a todos los inhibidores comerciales, pero son inhibidas por agentes quelantes como el EDTA y no

hidrolizan aztreonam. Cuando son producidas en gran cantidad causan resistencia a imipenem, meropenem, penicilinas y todas las cefalosporinas.

Durante mucho tiempo fueron consideradas como raras curiosidades por ser producidas por microorganismos de escasa importancia clínica y por ser codificadas cromosómicamente, lo que restringía su capacidad de diseminación.

En 1990, en Japón se informaron las primeras MBL de origen plasmídico, denominadas IMP, producidas tanto por enterobacterias como por especies de *Pseudomonas* y *Acinetobacter*.

Las enzimas IMP se difundieron lentamente a otros países orientales y en 1997 fueron detectadas en Europa y luego en Canadá y Brasil.

Una segunda familia de MBL, la VIM, fue detectada en Italia en 1999 y en la actualidad presenta una amplia distribución geográfica en Europa, Sudamérica, Norteamérica y oriente.

Mundialmente, las MBL con mayor prevalencia y diseminación son las carbapenemasas plasmídicas denominadas IMP y VIM. Existen, además, cepas regionales como la MBL denominada SPM-1 descripta en América del Sur (Brasil), así como otras enzimas, como las SIM, GIM, NDM ((New Delhi Metalo-ß-lactamasa) y las del tipo OXA-48.

Todos los genes codificantes de las MBL, excepto SPM-1, se encuentran como genes en casete localizados en integrones, elementos genéticos que tienen la capacidad de reclutar genes en casete por un mecanismo de recombinación sitio específico, estando en general asociados a genes codificantes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos.

El documento del CLSI 2015, ha estandarizado dos ensayos confirmatorios para detectar enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp., sospechosas de producir carbapenemasas, denominados test de Hodge modificado solo aplicable a enterobacterias (Tabla 8, Figura 14) y el test Carba NP (Carbapenemase Nordmann-Poirel, Tabla 9) . Para el CLSI 2015, si se utilizan los criterios de interpretación establecidos en ese documento, ambos ensayos solo deben ser utilizados con propósitos epidemiológicos o para el control de infecciones.

Los aislamientos de enterobacterias productores de carbapenemasas usualmente presentan resistencia a uno o más carbapenemes (siendo la no susceptibilidad a ertapenem el mejor indicador para sospechar la producción de estas enzimas) y a una o más cefalosporinas de 3º generación (cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftizoxima, and ceftriaxona). Aunque algunos aislamientos, según la enzima que produzcan pueden ser sensibles a estas cefalosporinas.

Tabla 8. Test de Hodge. Ensayo confirmatorio para detección de enterobacterias sospechosas de producir carbapenemasas (adaptado de CLSI, M100-S25, 2015)

	Ensayos Confirmatorio
	Método de difusión
Microorganismos	Enterobacterias no susceptibles a uno o más carbapenemes
Medio	Agar Mueller-Hinton (M-H)
Concentración de antimicrobianos	Disco de Ertapenem 10 µg o Disco de Meropenem 10 µg
Inóculo	1) Preparar una suspensión 0,5 McFarland standard de la cepa ATCC *E. coli* 25922 en caldo o solución salina 2) Diluir 1:10 en caldo o solución salina 3) Inocular una placa de agar M-H en la forma habitual de realización del antibiograma por el método de difusión 4) Dejar secar la placa entre 3-10 minutos 5) Colocar la placa el número apropiado de discos de ertapenem o meropenem (para placas pequeñas 1 disco, para placas grandes entre 1.4 discos) 6) Con un ansa (10 µl) realice desde el disco hacia el borde de la placa una estría (de 20-25 mm de largo) del microrganismo que se desea ensayar. Incluya controles positivos (cepa productora de carbapenemasa) y controles negativos (cepa no productora) (Ver Figura 14).
Condiciones de incubación	35ºC, aeróbicamente
Tiempo de incubación	16–20 hs
Resultados	Luego de la incubación, examine las placas y observe si hay deformación del halo de inhibición de la cepa de *E. coli* ATCC 25922 en la intersección con la estría del microorganismo en estudio y/o la cepa productora de carbapenemasa (resultado positivo) (Ver Figura 14).
Nota	Algunos aislamientos pueden producir sustancia que inhiben el desarrollo de *E. coli* ATCC 25922. Si esto ocurre se observará alrededor de la estría de dichos aislamientos un área de inhibición. En este caso, el ensayo de Hodge no puede interpretarse. Tener en cuenta que no todas las cepas productoras de carbapenemasas dan resultado positivo con este ensayo como también que algunos resultados positivos del test no son debido a la producción de enzimas sino a otros mecanismos de resistencia a carbapenemes. Este ensayo presenta un alto nivel de sensibilidad y especificidad (> 90%) para detectar carbapenemasas del tipo KPC. Para otras carbapenemasas, la sensibilidad es variable, por ejemplo para las del tipo NMD es menor al 11%.
Control de calidad del método	*K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705— Ensayo de Hodge positivo *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1706— Ensayo de Hodge negativo

El test de Hodge, presenta como desventajas que pueden dar resultados falsos positivos en microorganismos que produzcan BLEE o AmpC asociada a perdida de permeabilidad por modificación de las sus porinas. Ocasionalmente, puede haber falsos negativos en cepas productoras de la enzima NMD.

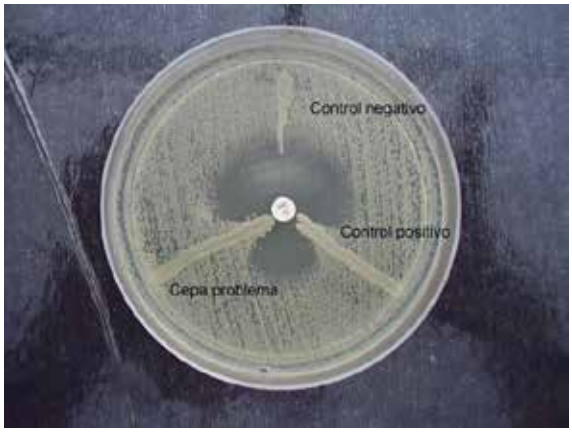


Figura 14. Test de Hodge. Observe la deformación del halo de inhibición de la cepa inoculada en la placa (E. coli ATCC 25922).La cepa problema y el control positivo degradan el antibiótico por acción de la enzima carbapenemasa permitiendo el desarrollo de E. coli.

El test Carba NP, permite detectar tanto enterobacterias como cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp., sospechosas de producir carbapenemasas. Es un ensayo rápido pero requiere la preparación de reactivos y contar con un reactivo de extracción de proteínas bacterianas (de origen comercia) en buffer Tris HCl pH 7,4.

Además, algunos resultados inválidos pueden ocurrir frente a algunas carbapenemasas codificadas cromosómicamente o del tipo OXA.

Para realizar este ensayo es necesario contar con los siguientes reactivos:

- Reactivo de extracción de proteínas bacterianas (de origen comercia) en buffer Tris HCl pH 7,4.
- Solución de Sulfato de zinc heptahidratado 10 mM (1,4 g $ZnSO_4 \cdot 7$ H2O en 500 ml de agua destilada. Conservar a temperatura ambiente por no más de 1 año).

- Solución de Rojo fenol 0,5% (1,25 gr de rojo fenol en 250 ml de agua destilada. Conservar a temperatura ambiente por no más de 1 año. Se debe mezclar bien cada vez que se va a utilizar).
- Solución de Hidróxido de sodio 0,1N (20ml NaOH 1N en 180 ml de agua destilada. Conservar a temperatura ambiente por no más de 1 año).
- Solución A: En un erlenmeyer o vaso de precipitado agregar 2 ml de la solución de rojo fenol al 0,5% a 16,6 ml de agua destilada. Agregar 180 µL de la solución de sulfato de zinc 10 mM. Ajustar el pH a 7,8 ± 0,1 con NaOH 0,1 N (o HCl 10% si el pH está demasiado elevado). Conservar a 4º-8ºC en viales protegidos de la luz por no más de 2 semanas (La solución debe permanecer de color rojo/ rojo-anaranjado, en caso de cambio de color no utilizarla).
- Solución B: Agregar a la Solución A imipenem en cantidad suficiente para alcanzar una concentración de 6 mg/ml. Los cálculos de la cantidad de Solución A necesaria se realizan considerando que se utilizan 100 µl para cada cepa a ensayar y que se deben incluir controles del reactivo y controles positivos y negativos. Si se prepara más cantidad de Solución B que la necesaria para el ensayo se puede fraccionar en tubos y conservarla a 4º-8ºC por no más de 3 días. Al agregar imipenem puede haber una ligera variación de color respecto a la Solución A.

Tabla 9. Test Carba NP. Ensayo confirmatorio para detección de enterobacterias, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. sospechosos de producir carbapenemasas (adaptado de CLSI, M100-S25, 2015)

	Ensayos Confirmatorio
	Método colorimétrico en microtubos
Microorganismos	Enterobacterias, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. no susceptibles a uno o más carbapenemes
Procedimiento	1- Utilice dos tubos eppendorf por paciente rotulados a y b. Incluir controles negativos y positivos 2- Agregue 100 µl del reactivo de extracción de proteínas bacterianas en cada tubo. 3- Inocule en los tubos a y b una ansada del microorganismo en estudio. Inocule el tubo de control positivo con el microrganismo ATCC productor de carbapenemasa y el tubo control negativo con el microorganismo ATCC no productor de carbapenemasa. (No utilizar cultivos obtenidos de medios selectivos o que contengan antibióticos) 4- Agite en vortex durante 5 segundos 5- Agregue 100 µl de la Solución A a los tubos a. 6- Agregue 100 µl de la Solución b a los tubos b. 7- Agite bien en vortex 8- Incubar a 35ºC durante 2 hs. Los aislamientos que dan resultado positivo antes de las 2 hs pueden ser informados como productores de carbapenemasas
Interpretación	- Tubo a y tubo b: color rojo/rojo-anaranjado: Resultado negativo: Cepa no productora de carbapenemasa - Tubo a color rojo/rojo-anaranjado y Tubo b: anaranjado claro, amarillo oscuro o amarillo: Resultado positivo: Cepa productora de carbapenemasa - Tubo a color rojo/rojo-anaranjado y Tubo b: anaranjado: Resultado inválido Si cualquiera de los tubos sin inocular presenta un color diferente a rojo-anaranjado, el ensayo es inválido.
Control de calidad del método	*K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705— productora de carbapenemasa *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1706— no productora de carbapenemasa

Este ensayo tiene un alto nivel de sensibilidad (> 90%) y especificidad (> 90%) para detectar enzimas tipo KPC, NDM, VIM, IMP, SPM y SME en los microorganismos para los que ha sido diseñado. La sensibilidad y especificidad varía frente a otros tipos de carbapenemasas (por ej. para las tipo OXA-48 la sensibilidad no supera el 11%) así como en algunas cepas muy poco productoras.

Ni el test de Hodge ni el test Carba NP diferencian que tipo de carbapenemasa está involucrada, si una de clase A (inhibida por ácido clavulánico) o una MBL (inhibida por EDTA).

Han sido propuestos otros ensayos para diferenciarlas. Uno de ellos es, el ya mencionado test de Jarlier con la diferencia de que, para observar la sinergia ("huevo o pelota de rugby") se reemplaza el disco que contiene ácido clavulánico por uno que contenga EDTA (10 µl 0,5M) los que pueden ser preparados en el laboratorio o de origen comercial (Figura 15).

Si se observa sinergia, la producción de la enzima ha sido inhibida por EDTA lo que permite sospechar que se está en presencia de una MBL.

Figura 15. Test de Jarlier positivo. Observe la sinergia (aumento del halo de inhibición de imipenem) en cercanía del disco de EDTA.

Es necesario hacer una especial referencia, en relación a las carbapenemasas del tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase).

Como fuera mencionado, dentro de las carbapenemasas de clase A, son las que mayor importancia epidemiológica.

Descriptas por primera vez en cepas de *K. pneumoniae* en Estados Unidos en 1996, en la actualidad se ha informado su presencia en otras enterobacterias y en no enterobacterias como *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, así como su difusión en todo el mundo, siendo las variantes KPC-1 y KPC-2 las más frecuentes.

En Argentina, los primeros hallazgos de KPC se produjeron a finales del año 2006, en cepas de *K. pneumoniae* y *C. freundii* recuperadas de un mismo sitio de infección en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. En el

mismo año se detecta en el país en la ciudad de Bariloche, la primera cepa de *P. aeruginosa* productora de KPC.

Desde su primera descripción, estas enzimas se han difundido en numerosas provincias de la Argentina. En el año 2012, el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas INEI - Anlis "Dr. Carlos G. Malbrán" informaba que en 142 servicios de salud de 14 provincias habían recuperado al menos 1 aislamiento de enterobacterias productoras de KPC (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *E. cloacae* y *K. oxytoca*).

Fenotípicamente, las enzimas KPC ejercen su actividad catalítica de forma eficiente sobre penicilinas, cefalosporinas, aztreonam y carbapenemes y no son inhibidas eficientemente por el ácido clavulánico y tazobactama, pero si por el ácido borónico, inhibidor que se utiliza para el reconocimiento fenotípico.

La inhibición por el ácido borónico no es exclusiva de las enzimas KPC ya que también es un inhibidor eficiente de las ß-lactamasas de tipo AmpC.

Hay varios métodos propuestos para la detección de estas enzimas, uno de ellos es el informado en la Tabla 8, el test de Hodge modificado propuesto por el CLSI 2015. Un segundo método es el propuesto por el CDC (Center por Desease Control and Prevention), el cual se realiza en dos etapas que incluyen un enriquecimiento previo en medio líquido conteniendo meropenem o ertapenem y luego el uso de un medio selectivo y diferencial como el agar Eosina Azul de Metileno (EMB) de Levine.

En la actualidad, existe disponible en el mercado un medio cromogénico (CHROMagar KPC) que ha demostrado tener una sensibilidad del 100% y especificidad de 98,4% en relación con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y que permite, respecto al método del CDC, disminuir en 24 hs el informe de los resultados obtenidos (resultados negativos en 24 hs y positivos en 48 hs).

Al igual que la propuesta del CLSI 2015, tanto el método del CDC como el medio cromogénico presentan algunas dificultades, en ambos casos se pueden presentar resultados falsos positivos o negativos.

En el método del CDC, ha sido descripto que la concentración de antimicrobiano que se adiciona al medio líquido puede no ser suficiente para inhibir microorganismos sensibles a los carbapenemes o puede seleccionar cepas resistentes a los carbapenemes por mecanismos distintos a la producción de KPC. Por otro lado, el medio cromogénico también puede seleccionar cepas resistentes a carbapenemes por otros mecanismos distintos a la producción de carbapenemasas (presencia de ß-lactamasas de espec-

tro extendido BLEE y/o impermeabilidad) y además posee baja sensibilidad para detectar aislamientos productores de KPC con bajo nivel de resistencia a carbapenemes.

Por lo tanto, en ambos casos se hace necesario realizar otros ensayos fenotípicos o moleculares para corroborar la presencia de enzimas KPC.

Entre estos ensayos fenotípicos, se encuentra una modificación del test de Jarlier que fuera descripto donde se reemplaza el disco de antibiótico que contiene ácido clavulánico por un disco de ácido borónico (300 µg, disponible comercialmente). La realización, lectura e interpretación es idéntica a la ya descripta (Figura 16). El inconveniente de este método es que el ácido borónico es un excelente inhibidor de otras ß-lactamasas como las AmpC por lo que, en microorganismos que habitualmente expresan estas enzimas como *C. freundii* puede dar un resultado falso positivo.

Figura 16. Test de Jarlier positivo. Observe la sinergia (aumento del halo de inhibición de meropenem) en cercanía del disco de ácido borónico.

> E1c- Ensayos para la detección de cepas sospechosas de producir ß-lactamasas AmpC

Las β-lactamasas del tipo AmpC se caracterizan por su capacidad de hidrolizar penicilinas, cefamicinas (cefoxitina, cefotetan), oximinocefalosporinas (ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona) y monobactamas (aztreonam), pero no son activas frente a cefalosporinas de cuarta generación (cefepima) ni carbapenemes (imipenem, meropenem, ertapenem). Además, no son inhibidas por ácido clavulánico pero sí por ácido borónico.

En algunos microorganismos (*E. cloacae, M. morganii, H. alvei, C. freundii, Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*) los genes que las codifican se encuentran en el cromosoma y su expresión es de bajo nivel o inducible, es decir se expresa cuando se las enfrenta a algunos ß-lactámicos considerados buenos inductores como amoxicilina, ampicilina, cefoxitina, imipenem y ácido clavulánico.

El fenómeno de inducción es reversible, o sea cuando desaparece el inductor las cepas dejan de expresar la enzima. Sin embargo, en determinadas circunstancias frente a la exposición a ß-lactámicos inductores algunas cepas pueden desreprimirse y expresar siempre la enzima aunque dejen de estar en presencia del inductor o sea se expresan constitutivamente.

También *E. coli*, produce AmpC C pero en forma constitutiva (no inducible) generando un bajo nivel de resistencia, al igual que *Shigella*, donde puede estar ausente por delección.

Existen además, AmpC plasmídicas, las que deben sospecharse, en especial, cuando algún aislamiento que no posee los genes que codifican estas enzimas en su cromosoma (*Klebsiella* spp., *Salmonella*, *Citrobacter koseri, Proteus mirabilis*) presentan un patrón de resistencia a ß-lactámicos distinto a su resistencia natural.

Además de la resistencia a ß-lactámicos mencionada, han surgido cepas que hidrolizan las cefalosporinas de cuarta generación (cefepima) y que son denominadas AmpC de espectro extendido. Estas variantes han sido detectadas principalmente en AmpC cromosómicas de enterobacterias y *Pseudomonas,* pero también en *K. pneumoniae* con AmpC plasmídica. Si además, el aislamiento presenta alteración de las porinas de su pared celular, puede aparecer resistencia a los carbapenemes, sin olvidar que puede existir co-resistencia a otros antimicrobianos lo que lo transforma en multirresistente.

Existen métodos fenotípicos para detectar la producción de AmpC, así si en el ensayo habitual de laboratorio se observa la formación de una pared entre un ß-lactámico poco inductor (cefalotina, cefotaxima) y un ß-lactámico que es buen inductor (cefoxitina, imipenem, ácido clavulánico) (Figura17), se puede inferir la presencia de una ß-lactamasa inducible.

Figura 17. Efecto pared. Observe la pared que se forma en el halo de cefotaxima (disco central) en cercanías de imipenem (disco de la derecha) y cefoxitina (disco de la izquierda).

Otro método, es una modificación del test de Jarlier utilizando un disco de ácido borónico (300 µg, disponible comercialmente) que es, como fuera mencionado, un excelente inhibidor de ß-lactamasas AmpC y discos de cefotaxima (30 µg) o ceftazidima (30 µg). La realización, lectura e interpretación es idéntica a la ya descripta (Figura 18).

Figura 18. Test de Jarlier positivo. Observe la sinergia (aumento del halo de inhibición de cefotaxima) en cercanía del disco de ácido borónico.

Para diferenciar AmpC plasmídicas de cromosómicas, excepto en los casos de aislamientos que no poseen los genes en su cromosoma como en *Klebsiella* spp. o que tienen una AmpC intrínseca no inducible como *E coli,* la única manera es por métodos moleculares.

En general, de detectarse estas enzimas en los estudios de susceptibilidad, se recomienda informar la posibilidad de que se produzca un fracaso terapéutico si se utilizan cefalosporinas de 3º generación para el tratamiento.

> E1d- Propuesta de SADEBAC para la detección fenotípica de mecanismos de resistencia a ß-lactámicos

La Sociedad Argentina de Bacteriología Clínica (SADEBAC) propone la ubicación estratégica de los discos para detectar fenotípicamente distintos mecanismos de resistencia a ß-lactámicos.

La Figura 19, muestra como ubicarlos y su interpretación.

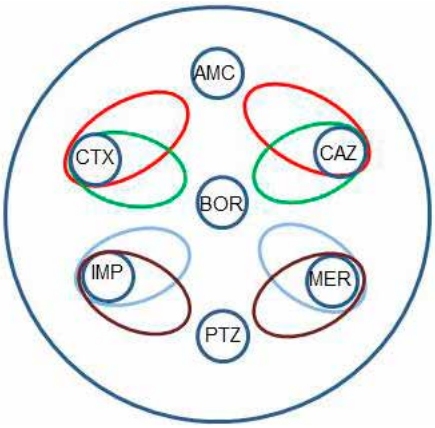


Figura 19. Ubicación estratégica de los discos (Extraído de Curso de Posgrado- Estudios moleculares de los mecanismos de resistencia a antibióticos en bacilos gram negativos. FBCB, UNL- FFyB, UBA, Dic. 2014)AMC: amoxicilina-clavulánico, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, BOR: ácido borónico, IMP: imipenem, MER: meropenem, PTZ: piperacilina-tazobactama.

Si se observa:

- Sinergia entre CTX y/o CAZ y AMC: indica fenotípicamente BLEE
- Sinergia entre CTX y/o CAZ y BOR: indica fenotípicamente AmpC
- Sinergia entre IMP y/o MER y BOR: indica fenotípicamente KPC
- Sinergia entre IMP y/o MER y PTZ: indica fenotípicamente carbapenemasa clase A.

> E1e- Comentarios Generales (recomendaciones del CLSI 2015)

Los comentarios que se describen a continuación corresponden a los que se encuentran en el documento M100-S25 del CLSI 2015, por lo que deben ser actualizados cada vez que esta institución produce un nuevo informe, habitualmente en forma anual.

Enterobacterias

En los aislamientos fecales de *Salmonella* y *Shigella* spp., debería solo ensayarse de rutina ampicilina, una fluorquinolona y trimetoprima-sulfametoxazol. En estos microorganismos, las cefalosporinas de 1º y 2º generación, las cefamicinas (cefoxitina, cefotetan) y los aminoglucósidos pueden parecer activos *in vitro*, pero no son efectivos clínicamente y no deberían ser informados como susceptibles.

En los aislamientos extraintestinales de *Salmonella* spp., se debería incluir, además, una cefalosporina de 3º generación y cloranfenicol si es solicitado por el médico tratante.

Los ensayos de susceptibilidad están indicados para cepas tifoideas de *Salmonella* (*S. Typhi* and *Salmonella Paratyphi* A–C) tanto de origen intestinal como extraintestinal, no así para cepas no tifoideas aisladas de muestras intestinales.

Enterobacter, Citrobacter, y *Serratia* pueden desarrollar resistencia a cefalosporinas de 3º generación durante el curso del tratamiento con estos antimicrobianos como resultado de la desrepresión de enzimas del tipo AmpC inducibles. Por lo tanto, de repetirse el aislamiento de estos microorganismos en un mismo paciente siempre se debe volver a determinar su susceptibilidad.

La susceptibilidad de *Morganella* spp., frente a cefixima o cefopoxima no se debe determinar por el método de difusión.

Los resultados de ampicilina permiten predecir los resultados de amoxicilina.

Los criterios de interpretación de cefalotina pueden ser usados para predecir la susceptibilidad a otros agentes orales (cefalexina, cefadroxilo).

En infecciones urinarias no complicadas causadas por *E. coli, K. pneumoniae* y *P. mirabilis*, es preferible utilizar cefazolina para predecir los resultados de otras cefalosporinas orales (cefaclor, cefalexina, cefuroxima, cefpodoxima). Cefpodoxima y cefuroxima acetil deben ser probadas individualmente ya que algunos aislamientos pueden ser susceptibles a estos agentes y resistentes a cefazolina.

En aislamientos de LCR, se debería ensayar cefotaxima y ceftriaxona en lugar de cefazolina.

Las enterobacterias susceptibles a tetraciclina son también susceptibles a doxiciclina y minociclina. Sin embargo, algunos microorganismos con susceptibilidad intermedia o resistencia a tetraciclina pueden ser susceptibles a doxiciclina, minociclina o ambas.

Los valores de CIM de *Proteus* spp., *Providencia* spp., y *Morganella morganii* frente a imipenem tienden a ser más elevados que frente a meropenem o doripenem. Estos aislamientos podría tener una CIM a imipenem más elevada por mecanismos distintos a la producción de carbapenemasas.

Los criterios de interpretación de ciprofloxacina y levofloxacina para *Salmonella* son distintos al del resto de las enterobacterias.

Los criterios de interpretación de ácido nalidíxico se han establecido para aislamientos de *E. coli* de origen urinario y todos los aislamientos de *Salmonella*.

Para *Salmonella*, ácido nalidíxico o pefloxacina puede utilizarse para predecir susceptibilidad disminuida a fluorquinolonas aunque no predice todos los mecanismos involucrados en la resistencia a quinolonas. La resistencia a ciprofloxacina, levofloxacina, ofloxacina, pefloxacina o ácido nalidíxico en cepas de *Salmonella* puede estar asociada a fallas clínicas o demora en la respuesta al tratamiento con fluorquinolonas.

Fosfomicina solo debe ser ensayada en *E. coli* recuperadas del tracto urinario. De realizar CIM, el único método aprobado por el CLSI 2015 para determinar la susceptibilidad a este antimicrobiano es el de dilución en agar suplementado con glucosa-6-fosfato.

Pseudomonas aeruginosa

La susceptibilidad de los aislamientos de *P. aeruginosa* de pacientes con fibrosis quística puede realizarse con el método de difusión o con el método de dilución, pero la incubación debe extenderse al menos 24 horas antes de informar una droga como sensible.

P. aeruginosa puede desarrollar resistencia durante terapias prolongadas con todos los antimicrobianos. Por lo tanto, aislamientos inicialmente susceptibles pueden llegar a ser resistentes luego de tres a cuatro días de iniciada la terapia. Por lo tanto, de repetirse el aislamiento de este microorganismo en un mismo paciente siempre se debe volver a determinar su susceptibilidad.

Acinetobacter spp.

Las cepas susceptibles a tetraciclina son también susceptibles a doxiciclina y minociclina. Sin embargo, algunos microorganismos con susceptibilidad intermedia o resistencia a tetraciclina pueden ser susceptibles a doxiciclina, minociclina o ambas.

Burkholderia cepacia

Para este microorganismo, los únicos agentes en los que el CLSI 2015 ha establecido puntos de corte (por el método de difusión y por CIM) son: ticarcilina-clavulánico, ceftazidima, meropenem, minociclina, levofloxacina y trimetoprima-sulfametoxazol. En aislamientos que no sea urinarios, se puede ensayar cloramfenicol pero solo por CIM.

Stenotrophomonas maltophilia

Para este microorganismo, los únicos agentes en los que el CLSI 2015 ha establecido puntos de corte son: ticarcilina-clavulánico, ceftazidima, minociclina, levofloxacina y trimetoprima-sulfametoxazol. En aislamientos que no sea urinarios, se puede ensayar cloramfenicol pero solo por CIM.

Otros bacilos gram negativos NO enterobacterias

En otros bacilos gram negativos no fermentadores no fastidiosos incluyendo *Pseudomonas* spp. (pero excluyendo *P. aeruginosa, Acinetobacter* spp., *B. cepacia, B. mallei, B. pseudomallei,* and *S. maltophilia*), los métodos de difusión no han sido sistemáticamente estudiados por el CLSI 2015 por lo que no se recomiendan.

Para *B. mallei* y *B. pseudomallei*, los criterios de interpretación se encuentran en las tablas del documento M45-A2 del CLSI, 2010.

E2- *Staphylococcus* spp.

S. aureus es uno de los principales patógenos humanos por su capacidad de adquirir elementos exógenos por transferencia horizontal, tanto dentro de la especie como con otras especies, lo que le permite adaptarse fácilmente al medio y adquirir factores de resistencia a agentes antimicrobianos.

El primer mecanismo de resistencia de *S. aureus* informado durante los años 40' (siglo XX) fue el de la producción de penicilinasas codificadas por un gen denominado blaZ, capaz de degradar la penicilina.

Actualmente, la actualidad todas las cepas de *S. aureus* de origen hospitalario y más de 85% de los de origen comunitario son resistentes a la penicilina.

La producción de penicilinasas afecta no solo a las aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina) sino también a las ureidopenicilinas (piperacilina) y a las carboxipenicilinas (ticarcilina).

En los años 50, se dispuso de los primeros β-lactámicos estables a la acción de estas enzimas (cefalosporinas de 1º generación y meticilina semisintética) pero al poco tiempo (Inglaterra, 1961) surgieron cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina, conocidas como MRSA (en inglés de Methicillyn resistant *S. aureus*) o SAMR (en español).

Restringidas inicialmente al ambiente hospitalario, en los años 90 comenzaron a aparecer informes de aislamiento de cepas de SAMR en la comunidad en niños y adultos jóvenes sin factores de riesgo relacionados con los aislamientos hospitalarios. Estos aislamientos fueron denominados CA-MRSA (en inglés de Community acquired MRSA) o SAMR-CA en español, para diferenciarlos de los aislados del hospital denominados HA-MRSA (por la sigla en inglés Hospital acquired MRSA) o SAMR-HA en español.

La resistencia del SAMR es debida a la modificación de una proteína de unión a la penicilina (PBP) dando origen a una proteína alterada deno-

minada PBP2a y codificada por el gen *mecA* que se encuentra en un casete cromosómico móvil y que le confiere resistencia a todos los ß-lactámicos (penicilinas con y sin combinaciones con inhibidores de ß-lactamasas, cefalosporinas, excepto aquellas con actividad anti-meticilino resistencia, y carbapenemes) por lo que en cepas meticilino resistentes los resultados a estos antimicrobianos deben ser informados como resistentes o no ser informados. Esta resistencia no solo la presenta *S. aureus*, sino también estafilococos coagulasa negativos.

Entre ellos, particular cuidado hay que tener en el laboratorio con *S. lugdunensis* ya que si bien no produce la enzima coagulasa, algunos aislamientos producen la enzima ligada a la membrana denominada *cumpling factor* que se detecta si la prueba de detección de coagulasa se realiza en portaobjeto o en ensayos de aglutinación en látex, por lo que puede ser identificado erróneamente como *S. aureus. S. lugdunensis*, por otra parte, es propenso a causar endocarditis de válvulas nativas de curso fulminante y altamente destructivo, a diferencia de otros estafilococos coagulasa negativos que afectan principalmente válvulas protésicas.

La expresión fenotípica de la meticilino resistencia puede ser homogénea o heterogénea. La resistencia heterogénea significa que, a pesar que todas las células de una población poseen el gen, sólo algunas lo manifiestan, haciendo difícil su detección en el laboratorio por los métodos habituales.

Esta expresión heterogénea varía según las condiciones de cultivo y el ß-lactámico que se use para detectar la meticilino resistencia. La mayoría de los aislamientos clínicos presenta este patrón heterogéneo cuando se utilizan condiciones rutinarias de cultivo. Sin embargo una población heterogénea puede aparecer como homogénea cuando se cultivan en un medio hipertónico suplementado con NaCl. Estos cambios en la expresión de la resistencia son transitorios y completamente fenotípicos.

Las cepas meticilino resistente hospitalarias usualmente son también resistentes a las fluorquinolonas, aminoglucósidos, macrólidos, cetólidos, azálidos, clindamicina y tetraciclinas clásicas, quedando como opción terapéutica para estos aislamientos el uso de glucopéptidos (vancomicina, teicoplanina).

A diferencia de las cepas hospitalarias, los SAMR recuperados de la comunidad son resistentes a todos los antibióticos ß-lactámicos, pero permanecen sensibles a otros antimicrobianos como aminoglucósidos, fluorquinolonas, clindamicina y tetraciclinas.

En los años 1996 y 1997, surgieron las primeras cepas con sensibilidad disminuida a los glucopéptidos, denominadas por sus siglas en inglés: VISA (Vancomycin intermediate *S. aureus*), y GISA (Glycopeptide intermediate *S. aureus*) y, aunque muy poco frecuentes, en 2002 se informaron aislamientos clínicos de *S. aureus* totalmente resistentes a glucopéptidos conocidos como VRSA (vancomycin-resistant *S. aureus*).

Al igual que en cepas meticilino resistentes, también se puede presentar una expresión fenotípica heterogénea, es decir en aislamientos vancomicina sensibles puede coexistir una subpoblación resistente a glucopéptidos (cepas hVISA) que no es detectada por métodos convencionales de laboratorio, en general en pacientes que ha estado expuestos a tratamientos con bajos niveles de vancomicina y que se han transformado en la forma más difundida de resistencia a glucopéptidos de *Staphylococcus* en todo el mundo. Si bien la cepas VISA, son habitualmente cepas de SAMR, ya han sido descriptas en cepas de *S. aureus* meticilino sensibles.

La CIM es el método que debe ser utilizado para determinar la sensibilidad a glucopéptidos en *Staphylococcus* spp., ya que el método de difusión no diferencia las cepas con susceptibilidad reducida a vancomicina de cepas susceptibles en *S. aureus* ni tampoco diferencia entre cepas vancomicina sensible, intermedia o resistente en estafilococos coagulasa negativa.

El método de detección propuesto por el CLSI 2015 se detalla en la Tabla 13 al tratar la resistencia a glucopéptidos en *Enterococcus* spp.

Como opciones terapéuticas para estos aislados multirresistentes se han desarrollado fármacos como linezolid, aunque ya ha sido informado la aparición de cepas resistentes relacionados a tratamientos prolongados, y la daptomicina que no puede ser usadas para el tratamiento de neumonías porque es inactivada por el surfactante pulmonar, por otra parte se han informado fracasos terapéuticos por lo que debe ser monitoreada *in vitro*.

Otro fenómeno de resistencia que presentan *Staphylococcus*, es la resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B. El mecanismo y su método de detección (Tabla 14) es igual al involucrado frente a estos antimicrobianos en *Enterococcus* spp., *Streptococcus pneumoniae*, y *Streptococcus* β-hemolíticos, por lo que se desarrolla en conjunto más adelante.

> E2a- Ensayo de *screening* para la detección de ß-Iactamasas en *Staphylococcus* spp.

Si bien las cepas de *Staphylococcus* sensibles a penicilinas son poco frecuentes, en caso de detectarlas en el laboratorio se hace necesario ensayar la producción ß-lactamasas, en especial en infecciones donde se requiere una acción bactericida del antibiótico como en las endocarditis.

El método propuesto por el CLSI 2015 (Tabla 10), es más sensible que los ensayos basados en la utilización de la cefalosporina cromogénica nitrocefín para detectar la producción de ß-lactamasas en *S. aureus* y es el recomendado en caso de que se utilice como único ensayo de detección.

En aquellos laboratorios donde se use nitrocefín, si el ensayo es positivo los resultados deben informar que la cepa es resistente a penicilina (producción de ß-lactamasa positiva), pero si el ensayo es negativo se debe realizar el método propuesto por el CLSI 2015.

El método consiste en la observación cuidadosa de la apariencia del borde del halo de inhibición de penicilina.

Si el borde del halo se presenta bien delimitado ("afilado" o como *cliff* o acantilado" así se lo define) indica que la cepas produce ß-lactamasa, por el contrario si el borde de la zona es borroso (*beach* o "playa") indica que la cepa no produce la enzima.

Para *S. lugdunensis*, los ensayos de detección de ß-lactamasas no son necesarios porque los aislamientos productores de ß-lactamasa siempre dan halos de inhibición, en el método de difusión, o valores de CIM a penicilina en el rango de resistente.

En otros estafilococos coagulasa negativos, se utiliza la prueba del nitrocefín. Si el resultado es negativo se debe reiterar utilizando un inóculo obtenido del borde del halo de penicilina donde se encontraría la cepa, eventualmente, inducida a producir la enzima.

Tabla 10. Ensayo de *screening* para detección de ß-lactamasas en cepas de *Staphylococcus* (adaptado de CLSI, M100-S25, 2015).

Ensayo	Producción de ß-lactamasa
Microorganismos a ensayar	*S. aureus* con MICs ≤ 0.12 µg/ml o halos de inhibición ≥ 29 mm a penicilina
Método	Método de difusión con discos. Se prefiere el disco de penicilina (10 UI) antes que el disco de ampicilina.
Cepas control de calidad	Control negativo: *S. aureus* ATCC 25923 (borde borroso del halo de inhibición del disco de penicilina) Control positivo: *S. aureus* ATCC 29213 (borde definido del halo de inhibición del disco de penicilina
Informes	Las cepas productoras de ß-lactamasa son resistentes a penicilina, aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina), ureidopenicilinas (piperacilina) y carboxipenicilinas (ticarcilina).

> E2b- Ensayo de *screening* para la detección de meticilino resistencia (oxacilino resistencia) en *Staphylococcus* spp.

La detección del gen *mecA* o de la proteína que este expresa, la PBP2a son los métodos más confiables para detectar la meticilino resistencia. Sin embargo, dada la dificultad de su implementación en laboratorios de mediana a baja complejidad se han desarrollado métodos de *screening* que pueden ser fácilmente realizados y que permiten, en la mayoría de los casos, obtener resultados confiables.

La detección del gen *mecA* por métodos de amplificación mediante PCR es un método relativamente rápido y eficaz, pero no disponible en la mayoría de laboratorios clínicos. Este método posee la ventaja de no estar sujeto a las condiciones del crecimiento de la cepa, se puede aplicar a gran número de aislados y permitiría aclarar dudas cuando los valores de CIM de las cepas en estudio se encuentran cercanos al límite.

También se pueden utilizar para la detección de SAMR métodos de hibridación in situ. Son métodos caros cuyos resultados se obtienen en 90 minutos.

Existe una prueba rápida de aglutinación de partículas de látex que permite la detección de SAMR poniendo de manifiesto la PBP2a.

Las partículas de látex sensibilizadas con un anticuerpo monoclonal dirigido contra PBP2a reaccionan después de una extracción específica de la PBP2a presente en los SAMR dando una aglutinación visible a simple vista. Es un test simple y rápido (15 minutos).

El método estandarizado como *screening* para detectar la meticilino resistencia propuesto por el CLSI 2015, es el de difusión con discos de cefoxitina cuyos resultados son más fáciles de leer que con el disco de oxacilina frente a *S. aureus* (Tabla 11).

Por otra parte, el disco de cefoxitina es el método preferido para detectar meticilino resistencia en estafilococos coagulasa negativo, ya que solo para *S. epidermidis* hay correlación entre el disco de oxacilina y el gen *mecA*.

Este método es considerado un excelente método de detección de SAMR por su alta especificidad (94,7%), sensibilidad (98,9%) y concordancia con los resultados de PCR (93,6%). El disco de cefoxitina tiene una especificidad más alta e igual sensibilidad al de oxacilina para los estafilococos coagulasa negativos.

El ensayo se realiza con la técnica estándar para la realización del antibiograma. La incubación para *S. aureus* y *S. lugdunensis* es de 16-18 horas y para los estafilococos coagulasa negativos 24 horas. Solo de observar a las 18 horas resistencia a cefoxitina en estafilococos coagulasa negativo se podrían informar los resultados.

De usarse una penicilina para detectar meticilino resistencia, se debe utilizar oxacilina ya que es más resistente a la degradación y detecta mejor las cepas con heterorresistencia. En este caso, el CLSI 2015 propone utilizar un método de dilución en agar M-H al que se adiciona 4% NaCl (Tabla 10). Puede también, realizarse la búsqueda de cepas meticilino resistentes determinando la CIM en caldo a cefoxitina (Tabla 11).

Actualmente, se encuentran en el mercado medios de cultivo cromogénicos, selectivos y diferenciales por la incorporación de cefoxitina, para la detección rápida y sencilla de SAMR.

Estos medios simplifican el *screening* de pacientes mediante la detección directa de SAMR en una placa en 18-24 horas sin necesidad de ninguna prueba adicional y proporcionan una lectura sencilla, pues simplemente consiste en ver el color de la colonia (rosa).

Fundamentalmente, permiten identificar a los pacientes colonizados en forma rápida, en especial en aquellos pacientes pre-quirúrgicos, reduciendo la posibilidad de infecciones. Para dichos pacientes, la toma de muestra se realiza de las narinas y la importancia del cultivo radica en in-

formar si está o no colonizado por SAMR. Un cultivo positivo indica la necesidad de primero descolonizar al paciente antes de realizar el acto quirúrgico.

Ha sido informado que el medio cromogénico muestra, a las 24 hs de cultivo, una sensibilidad de 95,6% y una especificidad del 95,8%. Aunque, también se ha demostrado que el aumentar la incubación a 48 hs aumenta la sensibilidad pero disminuye la especificidad permitiendo el desarrollo de *Enterococcus* spp. La ventaja del medio cromogénico radica en la rapidez en que se obtienen resultados.

Si bien raras, puede haber cepas resistentes a oxacilina por mecanismos distintos a la presencia del gen *mecA*. Estos aislamientos presentan una CIM a oxacilina ≥ 4 µg/ml (resistentes) pero dan un resultado negativo en los ensayos de *screening* con cefoxitina. De detectarse su presencia se deben informar como oxacilino resistentes.

Tabla 11. Ensayo de *screening* para detección de ß-lactamasas en cepas de *Staphylococcus* (adaptado de CLSI, M100-S25, 2015).

Ensayo de screening utilizando:			
Métodos	**Oxacilina**	**Cefoxitina**	
	Dilución en agar	**Método de difusión**	**CIM en caldo**
Microorganismos	*S. aureus*	*S. aureus*, *S. lugdunensis* y otros estafilococos coagulasa negativos	*S. aureus* y *S. lugdunensis*
Medio de cultivo	M-H + 4% NaCL	Agar M-H	Caldo M-H
Concentración de antimicrobiano	oxacilina 6 µg/ml	disco de 30 µg de cefoxitina	cefoxitina 4 µg/ml
Inóculo	Suspensión 0,5 MF	Método estándar del ensayo de difusión	Método estándar de dilución en medio líquido
Incubación	En aerobiosis, 33-35ºC. Temperaturas superiores no detectan meticilino resistencia		
Tiempo de Incubación	24 hs	*S. aureus*, *S. lugdunensis* : 16-18 hs Otros estafilococos coagulasa negativos: 24 hs	16-20 hs
Resultados	Observar con luz transmitida la presencia de colonias o de un ligero velo de crecimiento >1 colonia: indica oxacilino resistencia	*S. aureus*, *S. lugdunensis*: ≤ 21 mm = mecA positivo ≥ 22 mm = mecA negativo Otros estafilococos coagulasa negativos: ≤ 24 mm = mecA positivo ≥ 25 mm = mecA negativo	>4 µg/ml=mecA positivo ≤ 4 µg/ml=mecA negativo
Informe	Informar resistencia a todos los ß-lactámicos	Informar como sensible o resistente a oxacilina no a cefoxitina. Si son resistentes, informar resistencia a todos los ß-lactámicos excepto aquellos con actividad anti-SAMR	Informar como sensible o resistente a oxacilina no a cefoxitina. Si son resistentes, informar resistencia a todos los ß-lactámicos.
Cepas de control de calidad	*S. aureus* ATCC 29213	*S. aureus* ATCC 25923 mecA negativo (halo de cefoxitina 23-29 mm)	*S. aureus* ATCC 29213 mecA negativo (CIM a cefoxitina 1-4 µg/ml)

> E2c- Comentarios Generales
> (recomendaciones del CLSI 2015)

El estudio de sensibilidad de rutina en aislamientos urinarios de *S. saprophyticus* no está recomendado porque estas infecciones responden a las concentraciones alcanzadas en orina de los agentes antimicrobianos usualmente utilizados para el tratamiento de infecciones urinarias agudas no complicadas (nitrofurantoína, trimetoprima- sulfametoxazol, o una fluorquinolonas).

Tener en cuenta que los halos de sensibilidad frente a cefoxitina son diferentes según se trate de *S. aureus* y *S. lugdunensis* o de otros estafilococos coagulasa negativos. Así como, los valores de CIM frente a vancomicina son diferentes según se trate de *S. aureus* o de estafilococos coagulasa negativos.

Recordar, que durante un tratamiento prolongado, las cepas de *S. aureus* susceptibles a vancomicina pueden desarrollar resistencia intermedia, así como todos los *Staphylococcus* spp., pueden volverse resistentes a quinolonas tres o cuatro días después de iniciado el tratamiento. Por lo tanto, de repetirse el aislamiento de estos microorganismos en un mismo paciente siempre se debe volver a determinar su susceptibilidad.

Daptomicina no debe ser informada en aislamientos del tracto respiratorio.

Los microorganismos susceptibles a tetraciclina son también considerados susceptibles a doxiciclina y minociclina. Sin embargo, los microorganismos resistentes a con susceptibilidad intermedia a tetraciclina pueden ser sensibles a doxiciclina, minociclina o a ambos antimicrobianos.

Rifampicina no debe ser usada como único agente antimicrobiano.

Si se ensaya linezolid, los halos de inhibición deben ser examinados con luz transmitida. De detectarse resistencia por el método de difusión debe ser confirmada por CIM.

E3- *Enterococcus* spp.

Los enterococos se ubican como unos de los patógenos hospitalarios multirresistentes de mayor importancia clínica. En especial, por su rol como agentes etiológicos de endocarditis o de infecciones en pacientes debilitados ya sea por otras enfermedades de base o por hospitalizaciones prolongadas.

Su capacidad de adaptación a ambientes hostiles, su habilidad de colonizar y diseminarse desde el tracto gastrointestinal y su resistencia intrínseca y adquirida a antimicrobianos, los ha transformado en un serio problema clínico.

Todos los enterococos tienen resistencia intrínseca (parcial) a la penicilina. Además, las cefalosporinas, los aminoglucósidos (excepto para detectar alto nivel de resistencia), clindamicina y trimetoprima-sulfametoxazol pueden parecer activos *in vitro*, pero no son efectivos clínicamente.

Los ß-lactámicos (penicilina, ampicilina) no son bactericidas frente a estos microorganismos, siendo la tolerancia (ver páginas 49 a 51, concentración bactericida mínima o CBM) un fenómeno que puede aparecer rápidamente en algunas cepas.

En infecciones graves, como endocarditis, en que es necesario lograr bactericidia se utiliza la combinación de un ß-lactámico (o eventualmente vancomicina) con un aminoglucósido. Estos antimicrobianos por si solos no tienen efecto bactericida pero en combinación presentan un efecto bactericida sinérgico, siempre y cuando las cepas no sean resistentes a los ß-lactámicos y/o no presenten alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos.

El método estandarizado para detectar alto nivel de resistencia a aminoglucósidos en cepas de enterococos se describe en la Tabla 12 y para detectar resistencia a vancomicina (CIM ≥ 8 µg/ml) en la Tabla 13.

En el laboratorio, es fundamental la identificación de las especies de enterococos ya que una de las características del género es la diferencia en de los perfiles de susceptibilidad según la especie de que se trate. Existen además, cepas de enterococos con resistencia intrínseca (intermedia) a los glucopéptidos como son *Enterococcus gallinarum* y *Enterococcus casseliflavus.*

La resistencia a ampicilina, no es frecuente en *E. faecalis.* Esta resistencia puede deberse a la producción de ß-lactamasas (mecanismo raro en enterococos) las que son inhibidas por el uso de combinaciones con inhibidores de ß-lactamasas (ampicilina-sulbactama) pero que solo se observa en el laboratorio cuando se utiliza un alto inóculo o por la producción de proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) de baja afinidad. Las pruebas de dilución en agar o en caldo detectan satisfactoriamente los aislamientos con PBPs alteradas, pero no son efectivas para detectar las cepas productoras de ß-Iactamasas. Para la correcta detección de ß-Iactamasas en este género se debe utilizar la prueba de nitrocefín.

La mayor parte de las cepas de *E. faecium* son resistentes a ampicilina por la producción de una PBP alterada denominada PBP5 y vancomicina (y con menor frecuencia teicoplanina) por modificación de precursores del peptidoglicano y presentan además, alto nivel de resistencia a aminoglucósidos debida a mutaciones en los ribosomas o a la adquisición de enzimas capaces de degradarlos (aminoglucósidos nucleotidil-transferasas, enzimas modificadoras de aminoglucósidos), por lo que para estas cepas no existen muchas opciones terapéuticas, las que hay tienen efectos tóxicos o no existen suficientes ensayos clínicos para su utilización.

Entre los antimicrobianos alternativos, se encuentran quinupristin–dalfopristin una mezcla de dos estreptograminas semi-sintéticas. Carece de actividad frente a *E. faecalis* y ya se ha informado resistencia en cepas de *E. faecium* por diversos mecanismos que incluyen modificación de la droga, inactivación y eflujo. Además, la adquisición de genes de resistencia capaces de inactivar los macrólidos, licosamidas y estreptograminas (fenotipo MLSB) también disminuye la actividad bactericida de quinupristin–dalfopristin. El mecanismo y su método de detección (Tabla 13) es igual al involucrado frente a estos antimicrobianos en *Staphylococcus* spp., *Streptococcus pneumoniae*, y *Streptococcus* β-hemolíticos, por lo que se desarrolla en conjunto más adelante.

Otro antimicrobiano es linezolid, una oxazolidona bacteriostática que actúa inhibiendo la síntesis proteica. La resistencia a linezolid es rara aunque ha sido documentada.

Daptomicina es un lipopétido con actividad bactericida *in vitro* frente a enterococos (incluyendo aquellos resistentes a ampicilina y a vancomicina). Recientemente, se ha informado un aislamiento clínico de *E. faecalis* resistente a daptomicina como resultado de mutaciones puntuales que modifican la ultraestructura de la membrana y la pared celular.

Por último, para tigeciclina (una glicilciclina utilizada para el tratamiento de infecciones abdominales complicadas, infecciones de piel y tejidos blandos y neumonías y activa frente a bacilos gram negativos, cocos gram positivos y anaerobios) aún no se ha informado aislamientos clínicos resistentes de *E. faecium*, aunque se ha logrado en el laboratorio obtener cepas mutantes con sensibilidad disminuida a la tigeciclina.

En infecciones urinarias causadas por enterococos, los nitrofuranos (nitrofurantoína) continúan siendo una opción terapéutica.

> E3a- Ensayo de *screening* para la detección de alto nivel de resistencia a aminoglucósidos en *Enterococcus* spp.

La sinergia entre ampicilina, penicilina o vancomicina y un aminoglucósido puede ser predicha por el método de difusión usando discos de alta carga de gentamicina y estreptomicina o por CIM en agar o en medio líquido. No es necesario ensayar otros aminoglucósidos ya que sus actividades frente a enterococos no superan a gentamicina y estreptomicina.

Tabla 12. Ensayo de screening para detección de alto nivel de resistencia a aminoglucósidos en Enterococcus spp. (adaptado de CLSI, M100-S25, 2015).

Método	Gentamicina de alta carga			Estreptomicina de alta carga		
	Difusión con discos	Dilución en caldo	Dilución en agar	Difusión con discos	Dilución en caldo	Dilución en agar
Medio de cultivo	Agar Mueller-Hinton (M-H)	Caldo Infusión Cerebro-Corazón (ICC)	Agar ICC	Agar M-H	Caldo ICC	Agar ICC
Concentración de antimicrobiano	Disco de gentamicina 120µg	Gentamicina 500 µg/ml	Gentamicina 500 µg/ml	Disco de estreptomicina 300µg	Estreptomicina 1000 µg/ml	Estreptomicina 2000 µg/ml
Inóculo	Estándar del ensayo de difusión	Estándar del ensayo de dilución	Depositar sobre el agar 10 µl de una suspensión 0,5 MF	Estándar del ensayo de difusión	Estándar del ensayo de dilución	Depositar sobre el agar 10 µl de una suspensión 0,5 MF
Incubación	Aeróbica, 16-18 hs, 35ºC	Aeróbica, 24 hs, 35ºC	Aeróbica, 24 hs, 35ºC	Aeróbica, 16-18 hs, 35ºC	Aeróbica, 24 hs, 35ºC. Si es susceptible reincubar por otras 24 hs	Aeróbica, 24 hs, 35ºC. Si es susceptible reincubar por otras 24 hs
Resultados	6 mm=Resistente 7–9 mm=dudoso ≥10 mm=Susceptible	Cualquier desarrollo = Resistente	>1 colonia = Resistente	6 mm = Resistente 7–9 mm= dudoso ≥10 mm= Susceptible	Cualquier desarrollo = Resistente	>1 colonia = Resistente
Informe	Resistente: no habrá sinergia con agentes activos contra la pared celular (penicilina, ampicilina y vancomicina) Susceptible: habrá sinergia con agentes activos contra la pared celular (penicilina, ampicilina y vancomicina) si estos también son susceptibles. Si el ensayo de difusión da resultados dudosos se debe confirmar con CIM en agar o en medio líquido.					
Cepas control de calidad	E. faecalis ATCC 29212: 16–23 mm	E. faecalis ATCC 29212 – Susceptible		E. faecalis ATCC 29212: 14–20 mm	E. faecalis ATCC 29212 – Susceptible	

> E3b- Ensayo de *screening* para la detección de resistencia a vancomicina en *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp.

El ensayo de *screening* que se muestra en la Tabla 12 utiliza como medio de cultivo agar infusión cerebro-corazón (ICC). Este medio, si bien es el que ha sido estandarizado para esta prueba puede no detectar algunas cepas de *S. aureus* con susceptibilidad intermedia a vancomicina. Así, algunas cepas que presenten una CIM a vancomicina de 4 µg/ml podrían no desarrollar.

Para enterococos, en aquellas cepas que den un resultado positivo en el ensayo de *screening* se debe realizar pruebas bioquímicas (movilidad y producción de pigmento) a fin de distinguir las especies que tengan resistencia adquirida a glucopéptidos de aquellas con resistencia intrínseca (intermedia).

Tabla 13. Ensayo de *screening* para la detección de resistencia a vancomicina en *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp. (adaptado de CLSI, M100-S25, 2015)

Microorganismo	CIM a vancomicina ≥8 µg/ml	
	Staphylococcus aureus	*Enterococcus* spp.
Método	Dilución en agar	
Medio de cultivo	Agar ICC	
Concentración de antimicrobiano	vancomicina 6 µg/ml	
Inóculo	Preferiblemente, depositar sobre el agar 10 µl de una suspensión directa de las colonias 0,5 MF	
Incubación	Aeróbica, 24 hs, 35ºC	
Resultados	Examinar cuidadosamente con luz transmitida. Buscar > 1 colonia (o un delicado velo de desarrollo) > 1 colonia = susceptibilidad reducida presuntiva a vancomicina	> 1 colonia = resistencia presuntiva a vancomicina
Cepas control de calidad	*E. faecalis* ATCC 29212 – Susceptible	

> E3c- Comentarios Generales
(recomendaciones del CLSI 2015)

Los resultados de susceptibilidad a penicilina o ampicilina en enterococos no productores de ß-lactamasas, pueden predecir la susceptibilidad a amoxicilina, amoxicilina-clavulánico, ampicilina-sulbactama, piperacilina y piperacilina-tazobactama. Sin embargo, si solo se ensaya ampicilina no se puede predecir susceptibilidad a penicilina.

Si se confirma que la cepa es *E. faecalis,* la susceptibilidad a ampicilina puede usarse para predecir la susceptibilidad a imipenem.

De realizarse el ensayo con nitrocefin para detectar la producción de ß-lactamasa, un resultado positivo predice resistencia a penicilina, aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina) y ureidopenicilinas (piperacilina).

Cuando se ensaya vancomicina frente a enterococos, las placas se deben incubar 24 horas completas y ser examinadas con luz transmitida para detectar la presencia de colonias dentro del halo de inhibición. La sensibilidad intermedia o la resistencia a vancomicina deben ser confirmadas por CIM. También se puede usar la prueba de "screening" en agar con vancomicina (6 µg/ml), descripta en la Tabla 12, para aquellos aislamientos con CIM a vancomicina ≥8 µg/ml.

Daptomicina no debe ser informada en aislamientos del tracto respiratorio.

Los enterococos susceptibles a tetraciclina son también susceptibles a doxiciclina y minociclina. Sin embargo, si presentan susceptibilidad intermedia o resistencia a tetraciclina podrían ser susceptibles a doxiciclina, minociclina o ambas.

Rifampicina, no debe ser usada como único tratamiento antimicrobiano.

Fosfomicina, solo está indicada para aislamientos de E. *faecalis* del tracto urinario. De realizar CIM, el método aprobado es el de dilución en agar suplementado con glucosa-6-fosfato. No se debe realizar CIM a fosfomicina por el método de dilución en caldo.

Eritromicina no debe ser informada en aislamientos de enterococos del tracto urinario.

E4- Microorganismos fastidiosos

> E4a- *H. influenzae*

En *H. influenzae* la resistencia a ampicilina y otros ß-lactámicos es debida, generalmente, a la producción de ß-lactamasas. Aunque en mucha menor proporción, existen cepas resistentes a ampicilina ß-lactamasa negativa donde el mecanismo implicado es la producción de una PBP alterada (PBP3) con baja afinidad a penicilinas y cefalosporinas. Algunas cepas raras, presentan ambos mecanismos.

La producción de ß-lactamasas es debida a la adquisición de plásmidos, siendo los más frecuentes los que codifican ß-lactamasas tipo TEM. Entre estos, hay dos tipos de plásmidos, uno pequeño que solo transporta los genes *bla*TEM y confiere resistencia a ampicilina y amoxicilina, y uno de mayor tamaño, más común, que transporta además otros genes que le confieren resistencia a cloramfenicol, tetraciclina y kanamicina.

En el laboratorio, los resultados de susceptibilidad de ampicilina pueden predecir la actividad de amoxicilina, dado que la mayoría de los aislamientos producen una ß-lactamasa tipo TEM. En cepas resistentes a estos ß-lactámicos, un ensayo rápido como el del nitrocefín permite corrobora la producción de esta enzima.

En aquellas cepas poco frecuentes que son resistentes a ampicilina pero no productoras de ß-lactamasas, se debe considerar que también son resistentes a ampicilina-sulbactama, amoxicilina, amoxiciclina-clavulánico, cefaclor, cefuroxima, y piperacilina-tazobactama, aunque se observe susceptibilidad a estos agentes en los ensayos *in vitro*.

H. influenzae, es intrínsecamente resistente a macrólidos (ej. eritromicina), lincosamidas (ej. clindamicina), estreptogramina B (dalfopristin) y cetólidos (ej. telitromicina) por la presencia de un sistema de eflujo.

También, la resistencia de *H. influenzae* y *H. parainfluenzae* a tetraciclinas está asociada a este mecanismo. Pero, si los microorganismos son susceptibles a tetraciclinas pueden considerarse susceptibles a doxiciclina y minociclina.

Algunas cepas de *Haemophilus* pueden presentar resistencia a quinolonas, aunque son muy poco frecuentes. El mecanismo involucrado es una alteración del sitio blanco (tanto la ADN girasa como la topoisomerasa IV) de estos antimicrobianos.

La resistencia a cloramfenicol, antimicrobiano que no debe ser informado en aislamientos del tracto urinario, es plasmídica y se debe a la producción de una enzima denominada cloramfenicol acetiltransferasa.

> E4b- *S. pneumoniae*

La resistencia a los ß-lactámicos en *S. pneumoniae* ocurre por la producción de PBPs alteradas. Según cuales de estas proteínas han sido modificadas se puede presentar un bajo nivel de resistencia (PBP2x y PBP2b) o un alto nivel resistencia (PBP1a y PBP2x y/o PBP2b).

Esta resistencia es de particular importancia ya que amoxicilina, ampicilina, cefepima, cefotaxima, ceftriaxona, cefuroxima, ertapenem, imipenem y meropenem son antimicrobianos utilizados para el tratamiento de infecciones causadas por *S. pneumoniae*.

En estas infecciones hay que diferenciar si son producidas por aislamientos provenientes del líquido cefalorraquídeo (aislamientos meníngeos) o de otros sitios (aislamientos no meníngeos), ya que tanto los métodos como los resultados de sensibilidad a penicilina, aminopenicilinas y cefalosporinas de 1º, 2º, 3º, y 4º generación varían según se traten de cepas meníngeas o no meníngeas.

Los ensayos de difusión con discos para aislamientos meníngeos no son aplicables, siempre se debe utilizar la CIM, con las modificaciones ya descriptas para organismos fastidiosos, para determinar la sensibilidad a ß-lactámicos. Si puede utilizarse el método de difusión para determinar la sensibilidad a vancomicina.

En los aislamientos no meníngeos, se puede determinar la sensibilidad a penicilina por CIM o por el método de difusión. En aquellos aislamientos con CIM a penicilina ≤ 0,06 µg/ml o halos de oxacilina (que se utiliza en vez de penicilina) ≥ 20 mm, se puede predecir susceptibilidad a penicilina (oral y parenteral), ampicilina (oral o parenteral), ampicilina-sulbactama, amoxicilina, amoxicilina-clavulánico, cefaclor, cefepima, cefotaxima, cefpodoxima, ceftizoxima, ceftriaxona, cefuroxima, doripenem, ertapenem, imipenem, y meropenem.

Si los aislamientos muestran un halo de oxacilina ≤ 19 mm, se debe realizar la CIM a penicilina y cefotaxima o ceftriaxona o meropenem, ya que esta situación ocurre en cepas que pueden ser resistentes, de susceptibilidad intermedia, y aún susceptibles. La recomendación es que para estos

aislamientos no se debe informar que las cepas son resistentes a penicilina sin antes realizar el ensayo de CIM.

En pacientes donde se haga necesario utilizar macrólidos, como clindamicina, se debe determinar si las cepas no son resistentes a este antimicrobiano. El mecanismo y su método de detección (Tabla 14) es igual al involucrado frente a estos antimicrobianos en *Staphylococcus*, *Enterococcus* spp. y *Streptococcus* β-hemolíticos, por lo que se desarrolla en conjunto al tratar los estreptococos ß-hemolíticos.

Si se ensaya eritromicina, los resultados de susceptibilidad y resistencia pueden predecir la susceptibilidad o resistencia a azitromicina y claritromicina.

También, la susceptibilidad a levofloxacina predice la susceptibilidad a moxifloxacina. Sin embargo, si se ensaya moxifloxacina no se puede asumir igual resultado para levofloxacina. Por otro lado, existen cepas resistentes a quinolonas por modificación de las topoisomerasas.

Ni cloranfenicol ni clindamicina se deben ensayar en aislamientos del tracto urinario.

Recordar que rifampicina, no debe ser usada como único tratamiento antimicrobiano.

> E4b- *Streptococcus* ß-hemolíticos

Los estreptococos ß-hemolíticos para los que el CLSI 2015 ha establecido criterios de interpretación de las pruebas de susceptibilidad son aquellos que forman colonias grandes y que pertenecen a los grupos A (*S. pyogenes*), C, G y B (*S. agalactiae*). Aquellos que forman colonias pequeñas del grupo A, C, F, o G (grupo *S. anginosus* antes denominados *S. milleri*) son considerados parte del grupo de estreptococos viridans.

La penicilina y la ampicilina son consideradas las drogas de elección para el tratamiento de las infecciones causadas por estreptococos ß-hemolíticos. Si bien existen cepas no susceptibles a estos antimicrobianos son muy raras y hasta el momento no son cepas de *S. pyogenes,* que mantienen susceptibilidad total a la penicilina.

Estas cepas susceptibles a la penicilina, pueden ser consideradas susceptibles a todas las aminopenicilinas con o sin el agregado de inhibidores de ß-lactamasas, cefalosporinas y carbapenemes.

Una situación diferente es la sensibilidad frente a macrólidos y azálidos. La resistencia a estos antimicrobianos (macrólidos, lincosamidas y es-

treptogramina B) se debe a mecanismos similares en otras especies: *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., y *S. pneumoniae*.

En estreptococos, participan principalmente dos mecanismos: la metilación del sitio blanco de los macrólidos en el ribosoma bacteriano codificada por el gen *erm(*B) que puede ser constitutiva (se expresa siempre tanto en presencia o ausencia del antimicrobiano) o inducible (se expresa solo al estar en presencia de eritromicina) y un mecanismo de eflujo codificado por el gen *mef(*A).

Cuando el mecanismo involucrado es la metilación del sitio blanco, se compromete la actividad de macrólidos de 14 (eritromicina, claritromicina, roxitromicina), 15 (azitromicina) y 16 átomos (espiramicina), lincosamidas (lincomicina, clindamicina) y estreptogramina B. Este fenotipo se conoce como MLS_B.

Si el mecanismo involucrado es el eflujo, solo se compromete la actividad de los macrólidos de 14 y 15 átomos permaneciendo activos los macrólidos de 16 átomos, las lincosamidas y la estreptogramina B. Este fenotipo se conoce como fenotipo M.

En estafilococos, la resistencia a macrólidos puede deberse a la metilación del sitio blanco (gen *erm*), el mecanismo más frecuente; eflujo (gen *msrA*) o a un tercer mecanismo de resistencia en donde se produce la inactivación del antimicrobiano codificado por el gen *mpf.*

En enterococos, el mecanismo más frecuente es la metilación del sitio blanco. Además, pueden adquirir por conjugación el gen *mef*(A). Se han descripto cepas que expresan el gen *msrA* que le confiere resistencia a macrólidos y estreptogramina B. Por otra parte, la resistencia adquirida a las lincosamidas (lincomicina, clindamicina) se debe a la expresión del gen *lnu*(B) que produce una nucleotidiltransferasa que inactiva estos antimicrobianos.

En *S. pneumoniae*, al igual que en los estreptococos ß-hemolíticos y del grupo viridans, participan en la resistencia a macrólidos y azálidos, los mecanismos antes mencionados, aunque no se ha detectado o es extremadamente rara la expresión de un fenotipo MLS_B inducible.

En el laboratorio, se hace imprescindible detectar cual es el fenotipo involucrado en la resistencia ya que permite conocer que antimicrobianos están afectados.

El ensayo que se utiliza es el test de Seppala o prueba D (D-test) que se muestra en la Tabla 14.

En el caso de *S. agalactiae*, es necesario conocer que pueden aparecer cepas tolerantes a penicilina donde este antimicrobiano se comporta

como bacteriostático y no como bactericida. Esta situación obliga a realizar la CIM y CBM, muy especialmente en aislamientos de meningitis o de sepsis neonatal.

También, es fundamental la realización del D-test tanto para procesos infecciosos donde esté involucrado este microorganismo como para la profilaxis intraparto en mujeres embarazadas portadoras que tengan alto riesgo de anafilaxis si son tratadas con ß-lactámicos.

Como se observa en la Tabla 14, para el ensayo se utilizan discos de eritromicina y clindamicina pudiéndose obtener los siguientes resultados:

a. eritromicina y clindamicina sensibles (fenotipo S)
b. eritromicina resistente y clindamicina sensible sin achatamiento del halo de inhibición de la clindamicina (D-test negativo, fenotipo M),
c. eritromicina resistente y clindamicina sensible con achatamiento del halo de inhibición de la clindamicina (D-Test positivo, fenotipo MLS_B inducible o MLS_Bi:) (Figura 20) y
d. eritromicina y clindamicina resistentes (fenotipo MLSB constitutivo o MLS_Bc)

Para estos microorganismos, cloramfenicol o clindamicina no deben ser informados de rutina en aislamientos del tracto urinario.

Tabla 14. Ensayo de *screening* para la detección de resistencia inducible a clindamicina en *Staphylococcus* spp., *S. pneumoniae* y *Streptococcus ß-hemolíticos* (adaptado de CLSI, M100-S25, 2015).

Ensayo	D-test (difusión con discos)	
Microorganismos	***S. aureus*, *S. lugdunensis*, y *Staphylococcus* coagulasa negativa**	***S. pneumoniae* y *Streptococcus* β-hemolíticos**
Medio de cultivo	Agar Mueller-Hinton o agar sangre	Agar sangre ovina (5% v/v)
Discos de antimicrobianos	Eritromicina (15 µg) y clindamicina (2 µg) separados una distancia de 15-26 mm.	Eritromicina (15 µg) y clindamicina (2 µg) separados una distancia de 12 mm.
Inóculo	Estándar del método de difusión	
Incubación	Aeróbica, 35ºC, 16-18 hs	5% CO_2, 35 ºC, 20-24 hs
Resultados	eritromicina resistente- clindamicina sensible sin achatamiento del halo de inhibición de la clindamicina. D-test negativo eritromicina resistente- clindamicina sensible con achatamiento del halo de inhibición de la clindamicina: D-test positivo= resistencia inducible a clindamicina	
Informe	En cepas con resistencia inducible a clindamicina (D-test positivo) informar: resistente a clindamicina. Se puede incluir un comentario como “Este aislamiento se presume como resistente basado en la detección de resistencia inducible a clindamicina”	
Cepas control de calidad	***S. aureus* ATCC 25923**	***S. pneumoniae* ATCC 49619**

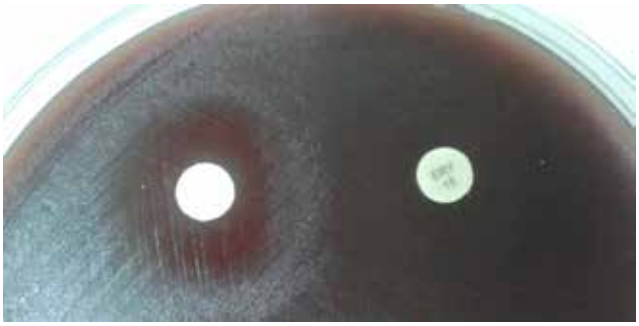


Figura 20. D-test positivo, resistencia inducible a clindamicina. Observe el achatamiento del halo de clindamicina en cercanía del disco de eritromicina.

> E4c- *Streptococcus* del grupo viridans

La sensibilidad a penicilina y ampicilina de los estreptococos del grupo viridans (incluye: grupo *mutans*, grupo *salivarius*, grupo *bovis*, grupo *anginosus* y grupo *mitis*) aislados de sitios normalmente estériles (LCR, sangre, hueso) debe ser determinada por CIM.

Las cepas resistentes o con sensibilidad intermedia a penicilina podrían requerir un tratamiento combinado con un aminoglucósido para lograr acción bactericida, por lo que se hace necesario determinar si existe o no alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos. Para ello, se puede usar el método de difusión descripto para enterococos (Tabla 12).

Para estos microorganismos, cloramfenicol o clindamicina **no** deben ser informados de rutina en aislamientos del tracto urinario, mientras que daptomicina no debe ser informada en aislamientos del tracto respiratorio.

> E4d- *Neisseria gonorrhoeae*

N. gonorrhoeae ha adquirido resistencia a los antimicrobianos por su habilidad de incorporar ADN exógeno por transformación, plásmidos por conjugación y por mutaciones puntuales espontáneas.

En este microorganismo pueden encontrase todos los mecanismos de resistencia: producción de enzimas ß-lactamasas tipo TEM que afectan las penicilinas, modificación de las PBP, sitio de acción de los ß-lactámicos, sobreexpresión de una bomba de eflujo que afecta principalmente a ceftriaxona, modificación de las porinas de la membrana externa impidiendo el ingreso de las penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas y macrólidos pudiendo estar presentes en una cepa más de uno de estos mecanismos.

La resistencia a las penicilinas y tetraciclinas es conferida por mecanismos cromosómicos o plasmídicos, mientras que la resistencia a fluorquinolonas y azitromicina es cromosómica.

En las cepas productoras de ß-lactamasas, puede realizarse la prueba del nitrocefín. Un resultado positivo predice resistencia a penicilina, ampicilina y amoxicilina. En general, los gonococos que dan un halo de inhibición ≤ 19 mm alrededor de un disco de penicilina de 10U son productores de ß-lactamasas.

Para tetraciclina, un halo de inhibición ≤ 19 mm usualmente indica una resistencia plasmídica (de alto nivel) que debe ser confirmada por CIM.

Si la resistencia es mediada cromosómicamente solo puede detectarse utilizando el método de dilución (CIM) en agar.

> E4e- *Neisseria meningitidis*

En *N. meningitidis*, la producción de una PBP alterada es el principal mecanismo que participa en la emergencia de cepas con susceptibilidad disminuida a penicilina. Esta susceptibilidad solo debe ser determinada por CIM.

La modificación del sitio blanco es también el mecanismo asociado a la susceptibilidad disminuida a quinolonas y rifampicina.

Para quinolonas, y solo con fines epidemiológicos, un halo de inhibición ≤ 25 mm en el disco de ácido nalidíxico se correlaciona con susceptibilidad disminuida a las fluorquinolonas.

Azitromicina, minociclina, ciprofloxacina, trimetoprima-sulfametoxazol y rifampicina solo son apropiados para la profilaxis de contactos.

Bibliografía consultada

Acardi H, Laczeski M, Oviedo P, Pegels, Quiroga M, Vergara M. 2012. Clindamicina y eritromicina: actividad en *Streptococcus agalactiae.* Resumen 5. pág. 11. VIII Jornada Científica -Instituto Universitario de Ciencias de la Salud. Santo Tomé, Corrientes, Argentina.

Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2012; 10(4): 266-278.

Artiles Campelo F, Cañas Pedrosa A, Álamo Antúnez I, Lafarga Capuz B. Fenotipos y mecanismos de resistencia a macrólidos y lincosamidas en aislados de *Streptococcus agalactiae* con significación clínica en un período de ocho años (2002-2010). *Rev Esp Quimioter*. 2012; 25(1): 42-46.

Bornett M, Pegels E, Martín Talavera B, Quiroga M. 2011. Búsqueda de metalo-β-lactamasas (MBL) en *Pseudomonas aeruginosa* por métodos genotípicos. EdUNaM. S. 01. pág. 107. VII Jornadas Científico- Tecnológicas. Posadas, Misiones, Argentina.

Casellas JM. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Rev Panam Salud Pública* 2011; 30(6): 519–28.

Casco RH, García SD, Perazz BE, de Mier C, Vay CA, Famiglietti AM. *Neisseria gonorrhoeae.* Resistencia a los antibióticos. Dermatol Argent . 2011; 17(5): 396-401.

Cercenado E.: *Enterococcus:* resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011; 29 (Supl 5): 59-65.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. M100-S25. Enero, 2015.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. M26-A. Septiembre, 1999.

Curso de Posgrado - Estudios moleculares de los mecanismos de resistência a antibióticos em bacilos gram negativos. FBCB, UNL-FFyB, UBA, Diciembre 2014.

Diekema DJ, Pfaller MA. Rapid detection of antibiotic-resistant organism carriage for Iinfection prevention. CID 2013; 56 (1 June).

Famiglietti A, Quinteros M, Predari SC, Corso A, Lopardo H, Casellas JM, Bantar C, Couto E, Galas M, Goldberg M, Gutkind G,

Kovensky Pupko J, Marín M, Nicola F, Pasterán F, Radice M, Soloaga R. "Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en cocos gram-positivos". *Rev Arg Microbiol*. 2003; 35(1): 29-40.

Famiglietti A, Quinteros M , Predari SC , Corso A , Marín M , Nicola F , Radice M, Lopardo H , Casellas JM , Bantar C , Couto E , Galas M , Goldberg M , Gutkind G, Kovensky Pupko J , Pasterán F, Soloaga R. "Actualización del Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en cocos gram-positivos". Año 2004. Disponible en: http://aam.org.ar/src/img_up/30072014.4.pdf

Famiglietti A, Quinteros M, Vázquez M, Marín M, Nicola F, Radice M, Galas M, Pasterán F, Bantar C, Casellas JM, Kovensky Pupko J, Couto E, Goldberg M, Lopardo H, Gutkind G, Soloaga R; Subcomisión de Antimicrobianos of the Sociedad Argentina de Bacteriología Clinica (Asociación Argentina de Microbiología). "Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en *Enterobacteriaceae"*. *Rev Arg Microbiol*. 2005; 37(1): 57-66.

Galloso P, Lezcano MT, Quiroga M. "Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo-ß-lactamasas". *Rev Cienc Tecnol* 2010; 14: 8-13.

Gardete S, Tomasz A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus. J Clin Invest*. 2015; 124(7): 2836-2840.

Gill VJ, Manning CB, Ingalls CM. Correlation of penicillin minimum inhibitory concentrations and penicillin zone edge appearance with staphylococcal beta-lactamase production. *J Clin Microbiol*. 1981; 14(4): 437-440.

Harrison OB, Brueggemann AB, Caugant DA, van der Ende A, Frosch M, Gray S, Heuberger S, Krizova P, Olcen P, Slack M, Taha MK, Maiden MC. Molecular typing methods for outbreak detection and surveillance of invasive disease caused by *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*, a review. *Microbiology*. 2011; 157(Pt 8): 2181-2195.

Jiménez Quiceno JN, Correa Ochoa MM. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: bases moleculares de la resistencia, epidemiología y tipificación. IATREIA 2009; 22(2): 147-158.

Lezcano MT, Martín Talavera B, Quiroga M. : *Aeromonas* spp. : Comportamiento frente a ß-lactámicos y producción de metalo-ß-lactamasas de mutantes derreprimidas. No. 341, pág. 472. XIII Jornadas Argentinas de Microbiología. Rosario, Argentina. 2008.

Lezcano MT, Galloso P, Pegels E, Villalba V, Jordá G, Oviedo P, Vergara M, Quiroga M. "Prevalencia de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes y primer informe de producción de metalo-ß-lactamasas en Posadas, Misiones". No. 343, pág. 474. XIII Jornadas Argentinas de Microbiología. Rosario, Argentina. 2008.

Livermore DM. "Current epidemiology and growing resistance of Gram-negative pathogens". *Korean J Intern Med*. 2012; 27: 128-142.

Montoya I, Mira M, Alvarez I, Cofré J, Cohen J, Donoso G, Torres JP. Resistencia inducible a clindamicina en *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. En: *Rev Chil Pediatr*. 2009; 80 (1): 48-53.

Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother*. 2013; 68: 487–489.

Oviedo P, Pegels E, Galloso P, Lezcano T, Quiroga M, Vergara M. 2008. *Streptococcus agalactiae* (SGB): fenotipos de resistencia a macrólidos. No. 340, p. 471. XIII Jornadas Argentinas de Microbiología. Rosario, Argentina.

Oviedo P, Pegels E, Quiroga M, Vergara M. La resistencia a eritromicina y clindamicina de *Streptococcus agalactiae* en mujeres embarazadas en la provincia de Misiones. *La Gaceta de Infectología y Microbiología Clínica 2010*, 4(4): 15-16.

Pegels E, Quiroga M, Oviedo P, Pereyra E, Galloso P, Vergara M. 2008. Caracterización fenotípica de resistencia a macrólidos en *Streptococcus agalactiae*: primer estudio en Misiones. *Rev Cienc Tecnol* 2008; 10a: 8-11.

Peshattiwar PD, Peerapur BV. ESBL and MBL mediated resistance in *Pseudomonas aeruginosa:* an emerging threat to clinical therapeutics. *J Clin Diag Res.* 2011; 5(8): 1552-1554.

Peterson LR, Shanholtzer CJ. Tests for bactericidal effects of antimicrobial agents: technical performance and clinical relevance. *Clin Microbiol Rev*. 1992; 5(4): 420-432.

Quiroga M, Cáceres MG, Stefañuk R, Villalba V, Rodriguez MM, Radice M, Gutkind G, Vergara M. 2008. Characterization of extended-spectrum ß-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli from Posadas, Misiones, Argentina. *J. Chemother,* 2008; 20(1): 130-133.

Quiroga M, Lezcano MT, Martin Talavera B, Cáceres M. G., Vergara M.: Beta-lactam resistance in variants of Aeromonas spp selected in vitro under antibiotic pressure. *J Chemother.* 2009; 21: 701-702.

Quiroga M, Pegels E, Lezcano MT, Oviedo P, Laczeski M, Vergara M. 2010. Variación en la susceptibilidad frente a las drogas recomendadas para profilaxis intraparto en Streptococcus agalactiae recuperados de mujeres gestantes colonizadas de la provincia de Misiones. *Revista Argentina de Microbiología*, No. 2 Vol. 42. Sup. 1. P. 244. XII Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires, Argentina

Quiroga M, Pegels E, Oviedo P, Laczeski M, Vergara M. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women in Misiones, Argentina. En: Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances. Microbiology Book Series-2011Edition. Formatex Research Center. España. 2011. Pp.: 444-447. Vol. 1

Quiroga M, Pegels E, Oviedo P,Pereyra E, Vergara M. 2008. Antibiotic susceptibility patterns and prevalence of group B Streptococcus isolated from pregnant women in Misiones, Argentina. Braz. *J. Chemother*. 2008; 39: 245-250.

Quiroga M, Stefañuk R, Cáceres M G, Villalba V, Vergara M. 2002. Comparación de métodos para la detección de ß-lactamasas de espectro extendido en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* aisladas en un Hospital de Posadas, Misiones. *Reseñas de Infectología & Vacunas.* 2002; Vol II Nº2: 18: 23.

Quiroga M, Vergara M. Behaviour against β-lactams in *Aeromonas* spp. isolated from extraintestinal infections. En: Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances. Microbiology Book Series-2011Edition. Formatex Research Center. España. 2011. Pp: 440-443. Vol. 1

Quiroga M, Villalba V, Lezcano MT, Gerula P, Valle M, Vergara M. Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum ß-lactamases producing strains isolated from a public hospital in Posadas, Misiones, Argentina. *Int J Antimicrob Agents.* 2002, 20(4): 313-314.

Radice M, Marín M, Giovanakis M, Vay C, Almuzara M, Limansky A, Casellas JM, Famiglietti A, Quinteros M, Bantar C, Galas M, Kovensky Pupko J, Nicola F, Pasterán F, Soloaga R, Gutkind G. Criterios de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en los bacilos gram negativos no fermentadores de importancia clínica: recomendaciones de la Subcomisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de

bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas, Asociación Argentina de Microbiología. *Rev Arg Microbiol*. 2011; 43(2): 136-153.

Rivera AM, Boucher HW. Current concepts in antimicrobial therapy against select Gram-positive organisms: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, penicillin-resistant pneumococci, and vancomycin-resistant enterococci. *Mayo Clin Proc*. 2011; 86(12): 1230-1242.

Rice LB. Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to ß-lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. *Mayo Clin Proc*. 2012; 87(2): 198-208.

Robilotti E, Deresinski S. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *F1000Prime Reports.* 2014, 6: 80.

Seral C, Gude MJ, Castillo FJ. Emergencia de β-lactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC ó cefamicinasas): origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas. *Rev Esp Quimioter*. 2012; 25(2): 89-99.

Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica Nº12. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos. Picaso JJ (Editor). 2000.

Stratton CW. Serum Bactericidal Test. *Clin Microbiol Rev*. 1988; 1(1): 19-26.

Stryjewski ME, Corey GR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolving pathogen. CID 2014; 58 (Suppl 1).

Tarai B, Das P, Kumar D. Recurrent Challenges for Clinicians: Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Vancomycin Resistance, and Current Treatment Options. *J Lab Physicians*. 2013; 5(2): 71-78.

Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20(2): 368-389.

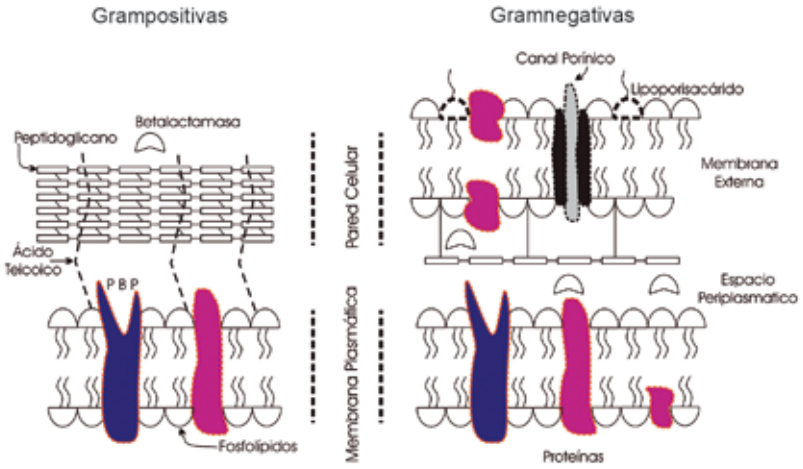
Unemo M, Nicholas RA. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhea. *Future Microbiol*. 2012; 7(12): 1401–1422.

Vergara M, y Cátedra de Bacteriología. Curso a distancia y presencial: Antibióticos, el Laboratorio y la Clínica. Actualización 2007. Secretaría de Extensión y Vinculación Tecnológica. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional

de Misiones. Posadas, Misiones. 20 de Agosto de 2007 al 16 de Diciembre de 2007.

WHO/CDC/CSR/RMD. "Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo". Año 2003. Disponible en: http://www.who.int/drugresistance/infosharing/WHO_CDS_CSR_RMD_2003_6_Manual_Laboratorio.pdf.

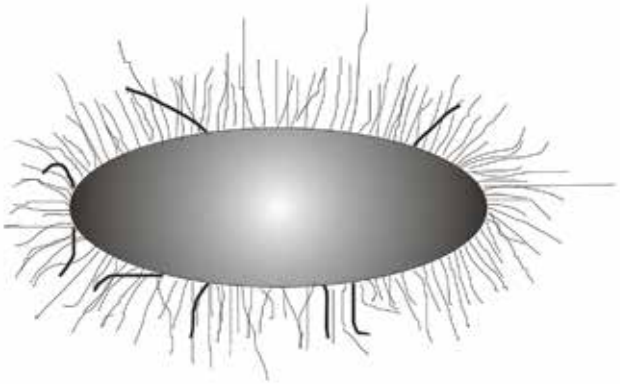
ANEXO GRÁFICO



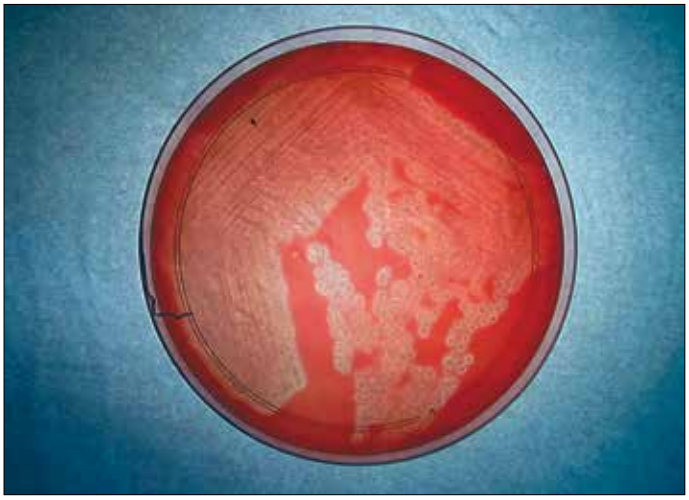
Representación esquemática de la estructura de la pared de bacterias gramnegativas y grampositivas.

Representación esquemática de cómo actúa el sistema de secreción tipo III.

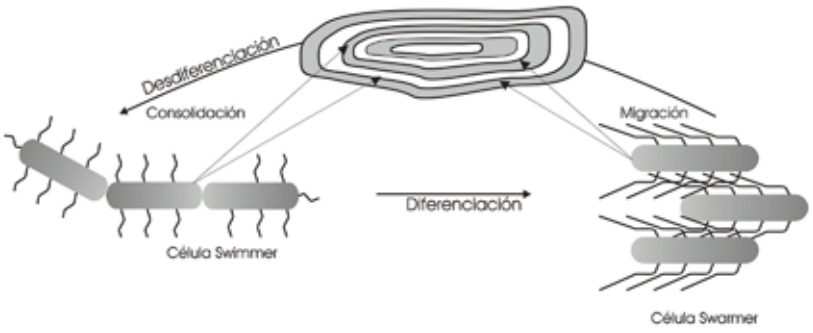
Representación esquemática de estructuras fimbriales utilizadas en la adherencia bacteriana.



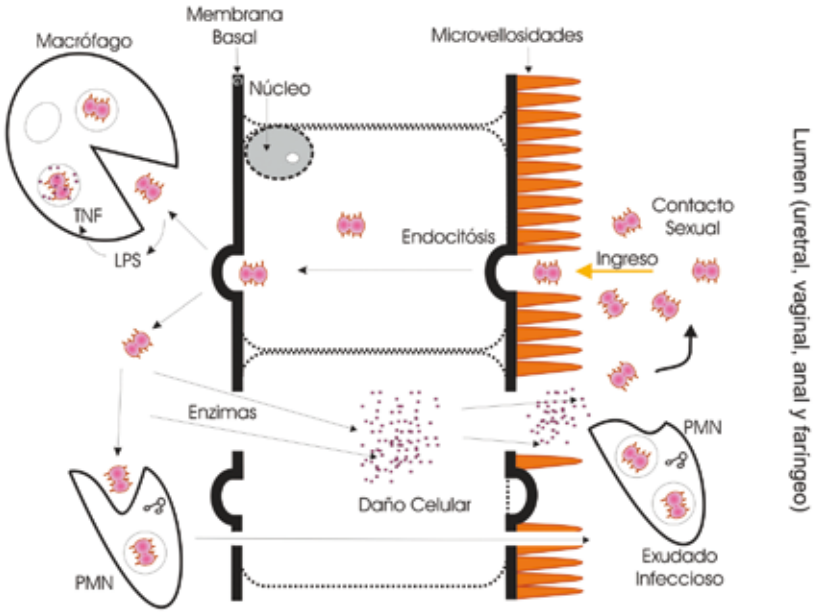
Streptococcus ß-hemolítico en placa de agar sangre ovina.



Representación del mecanismo de "swarming" y "swimming" (Adaptado de Mobley, H. L. T.; Warren, J. W. (Eds). Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management. ASM Press, Washington D.C., 1996).

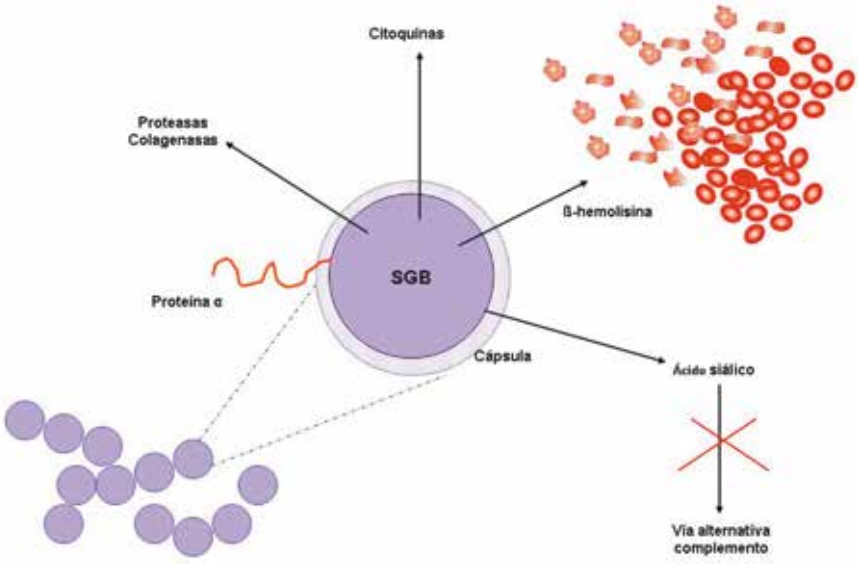


Paciente con diagnóstico de infección urinaria complicada. Observe aumento del tamaño renal derecho y dos áreas hipo-intensa que corresponden a abscesos renales en formación.

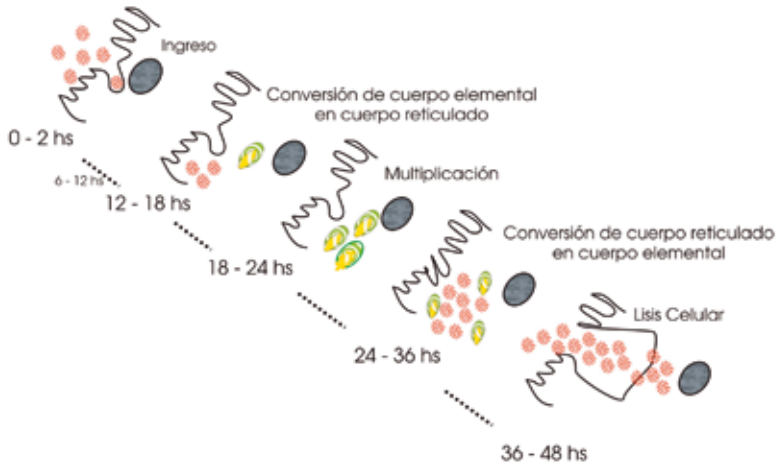


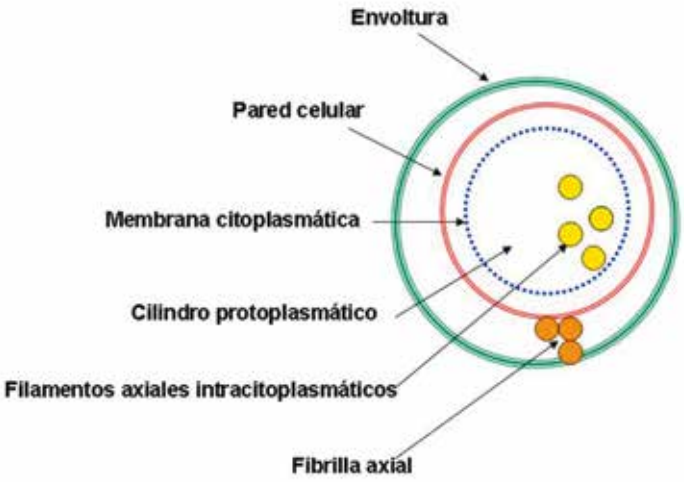
Representación esquemática del mecanismo patogénico en *N. gonorrhoeae.*

Factores asociados a la virulencia de *Streptococcus agalactiae* (SGB).

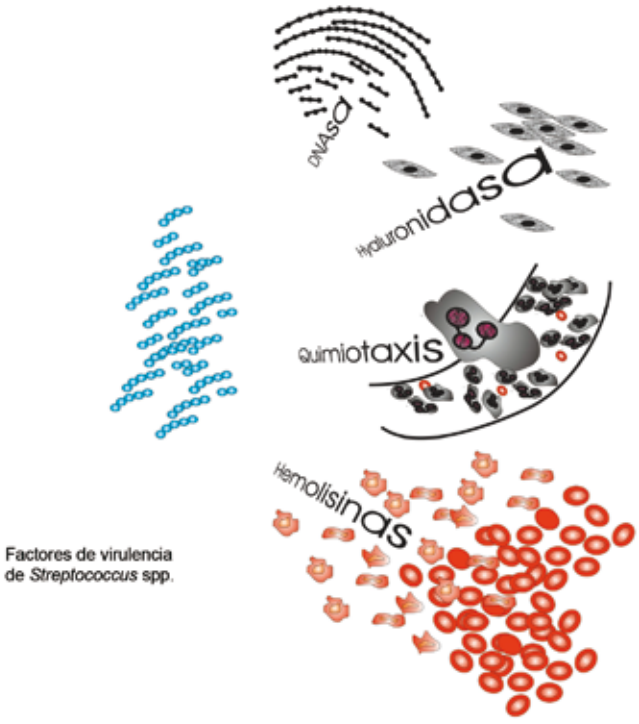


Chlamydia trachomatis: El ciclo de vida (CE: en rojo, CR: en verde).





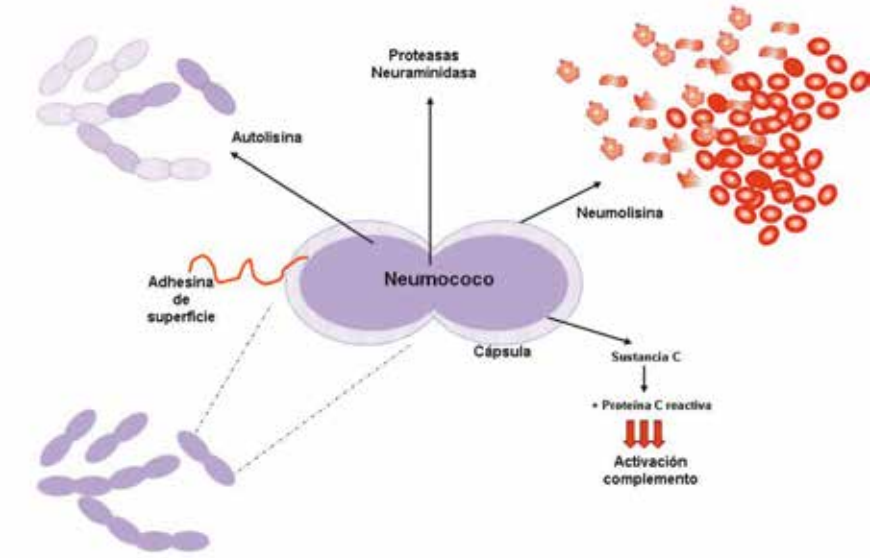
Representación esquemática de la estructura de *T. pallidum.*



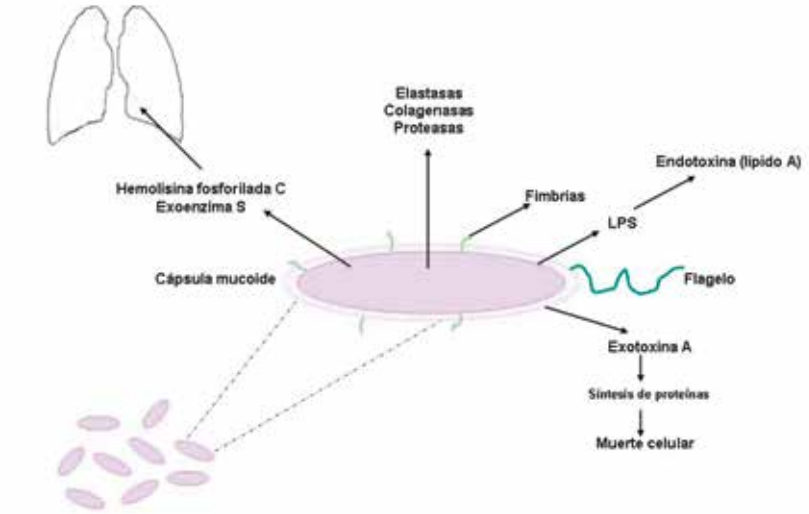
Factores de virulencia de *Streptococcus* spp.

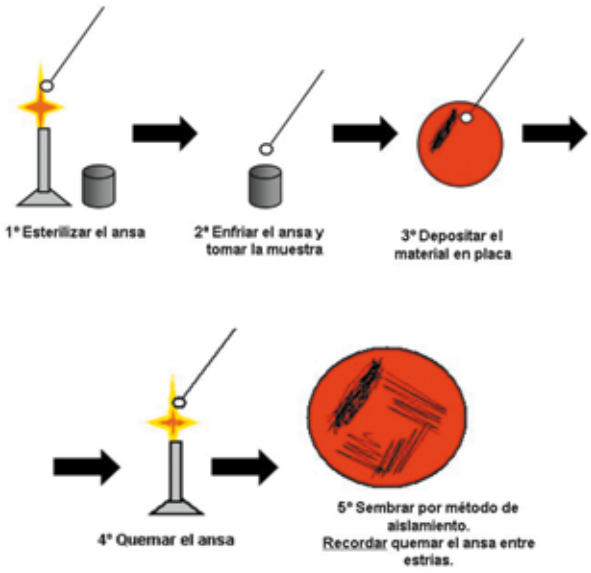
Algunos factores asociados a la virulencia de *Streptococcus pyogenes.*

Factores asociados a la virulencia de *Streptococcus pneumoniae.*

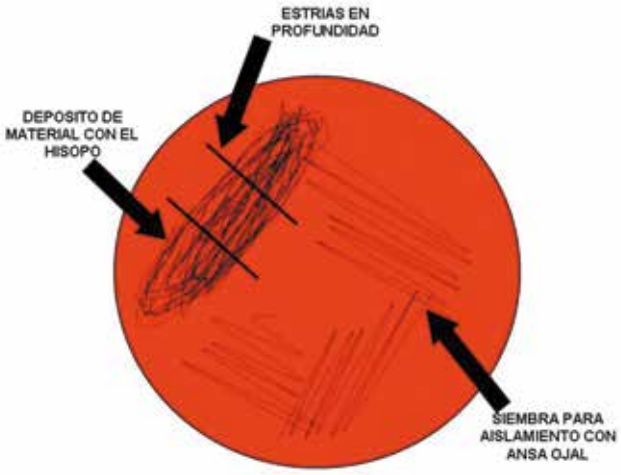


Factores asociados a la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa.*



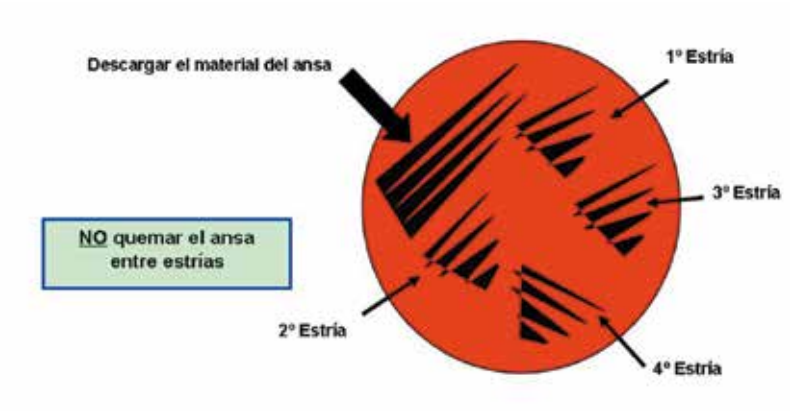


Esquema de técnica de siembra para aislamiento.

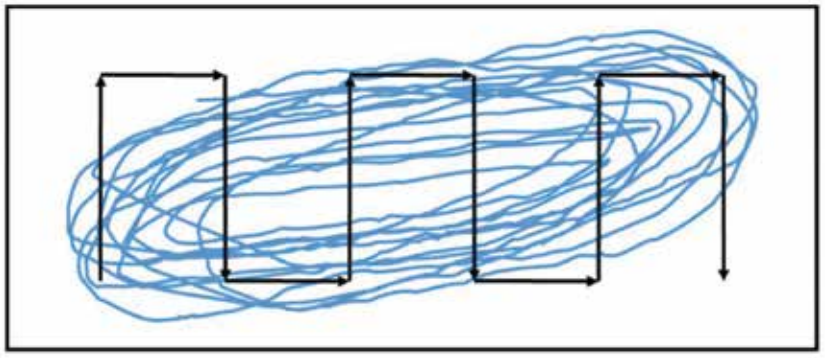


Procedimiento de siembra de hisopado de fauces.

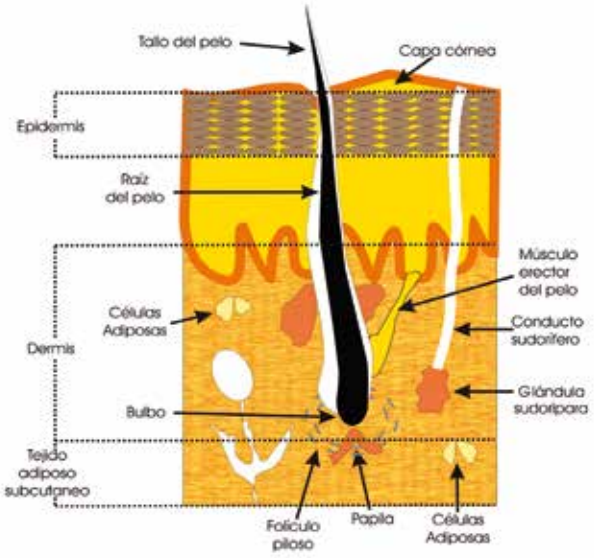
Metodología de siembra semicuantitativa.

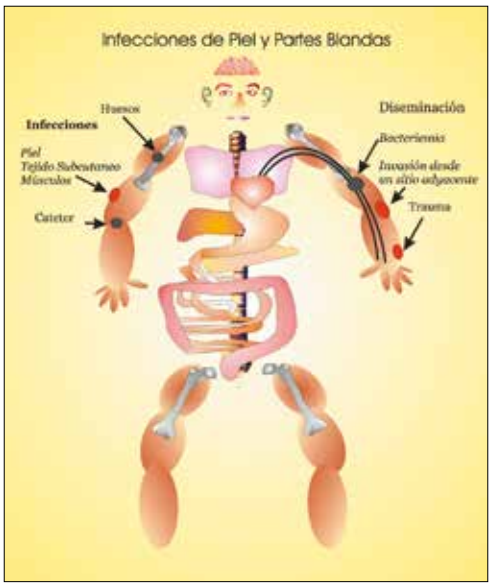


Método de observación microscópica.

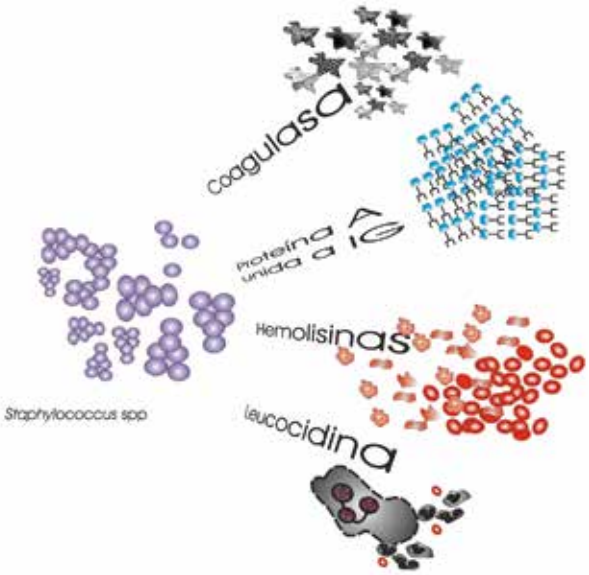


Representación esquemática de las capas de la piel.





Representación esquemática de las infecciones de piel y partes blandas.



Algunos factores asociados a la virulencia de *Staphylococcus* spp.

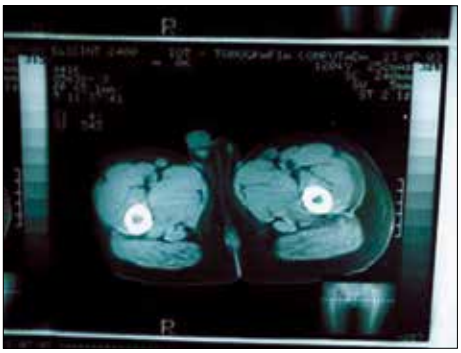
Paciente con erisipela severa, observe eritema edema con límites entre piel enferma y sana bien demarcados con necrosis superficial de la epidermis.

Lesión macerada, eritematosa, escamosa, pruriginosa en plieque.

Paciente con celulitis y linfangitis.

Paciente con celulitis y área fluctuante en cara anterior del tercio inferior de pierna. Muestra diagnóstica tomada por punción aspiración: secreción hemato purulenta.

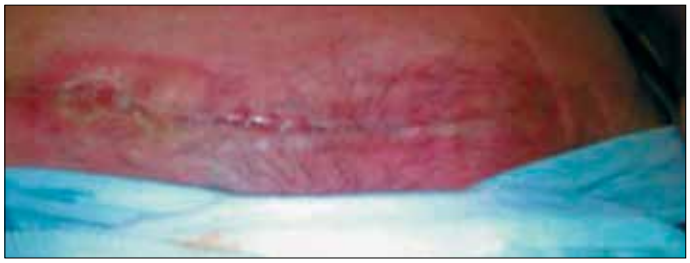
Paciente con celulitis necrotizante. Observe eritema perilesional, bordes necrozados y necrosis de tejido celular subcutáneo.



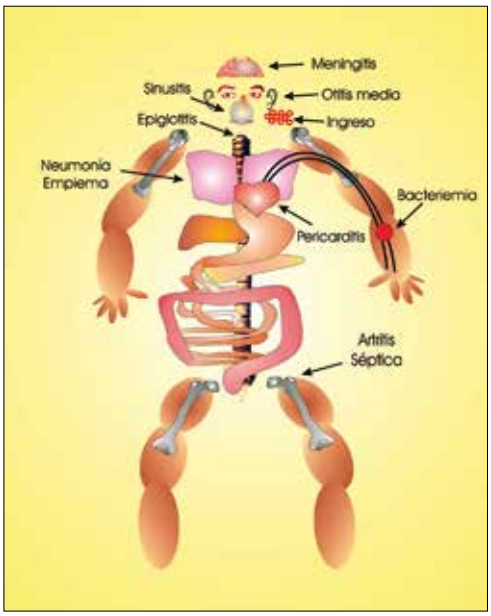
Paciente con piomiositis. Observe la presencia de área hipo-intensa en cara lateral de muslo derecho correspondiente a colección purulenta.

Paciente con absceso muscular en deltoides izquierdo. Muestra diagnóstica tomada por punción aspiración: secreción purulenta espesa.

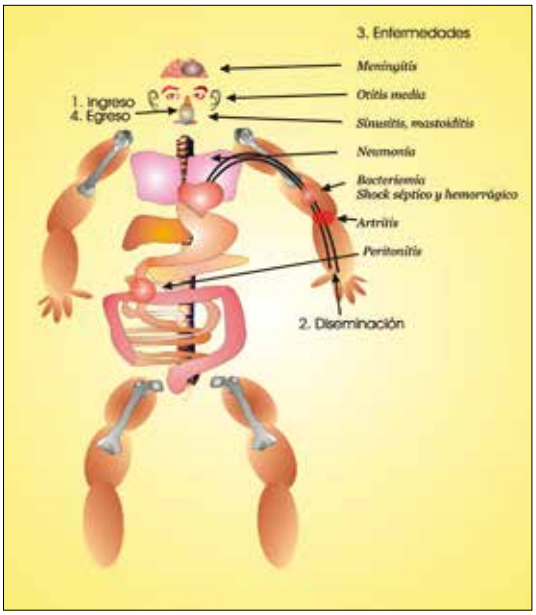
Paciente con infección de herida quirúrgica post-cesárea. Observe edema, eritema y secreción purulenta. En extremo derecho de la herida se observa la presencia de colección.



Paciente con infección de herida quirúrgica que presenta edema, eritema y secreción hemato-purulenta de salida espontánea. Infección protésica aguda de reemplazo total de cadera.

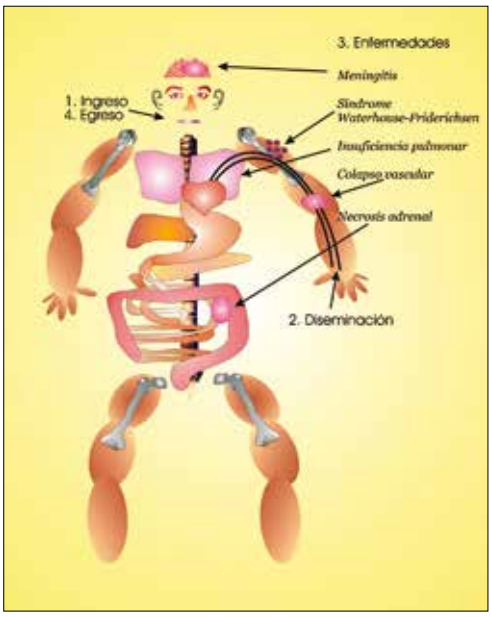


Localizaciones más frecuentes de *H. influenzae.*

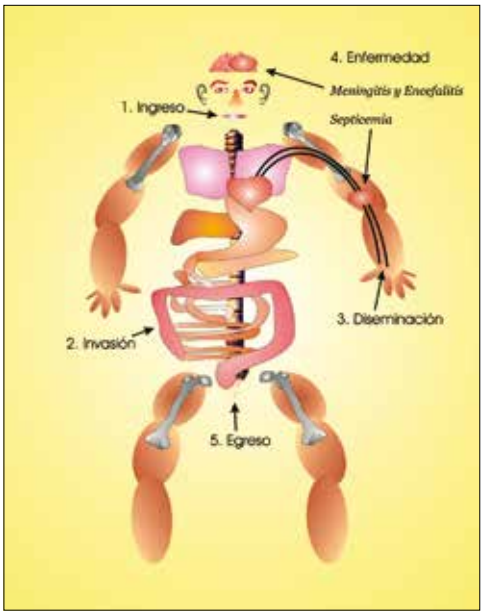


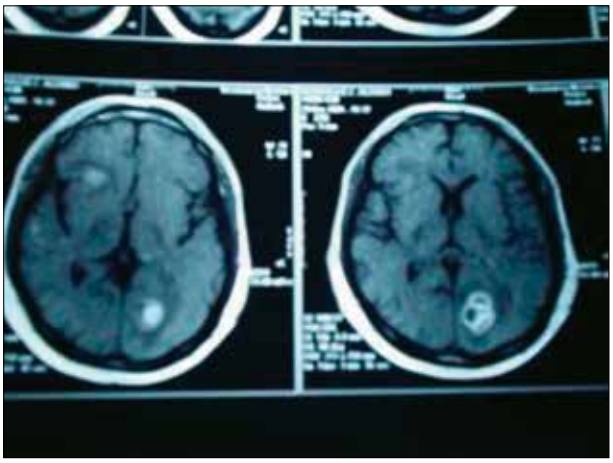
Localizaciones más frecuentes de *S. pneumoniae.*

Localizaciones más frecuentes de *N. meningitidis.*



Representación esquemática de la patogénesis en *L. monocytogenes.*

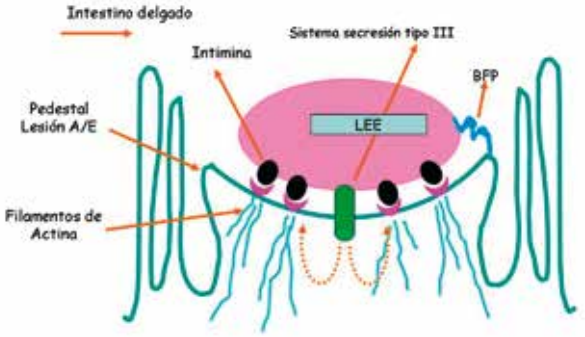




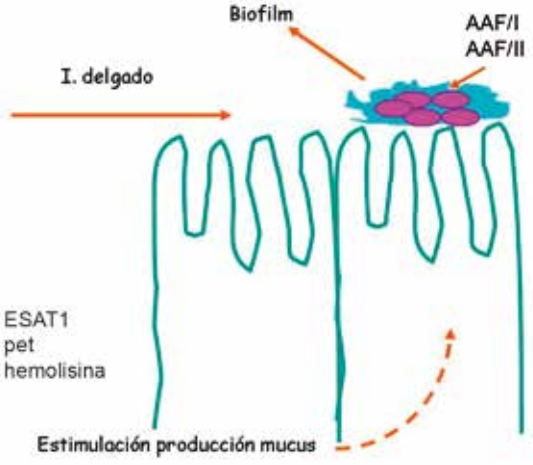
Paciente con diagnóstico de absceso cerebral. Observe absceso en lóbulo occipital derecho imagen hiperintensa que refuerza con el contraste.

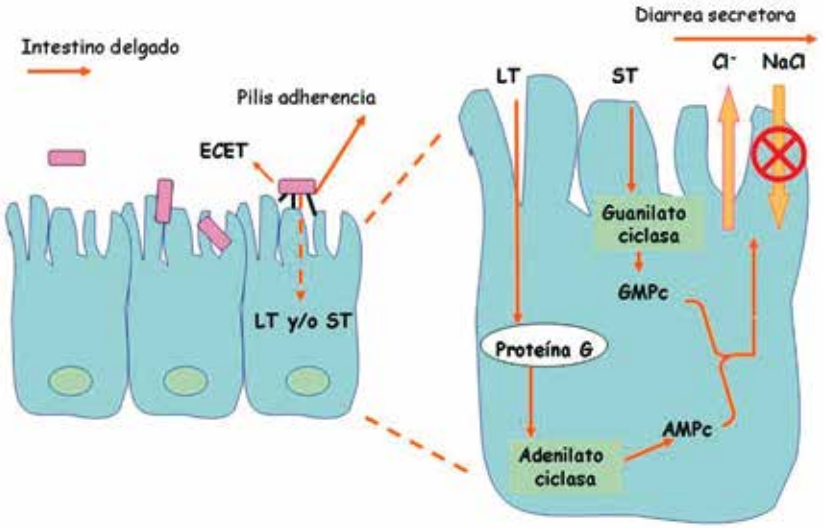
Paciente con meningococcemia. Observe las lesiones máculo papulares dismórficas purpúricas en tronco y abdomen.

Mecanismo de producción de diarrea por *Escherichia coli* enteropatógeno (ECEP).

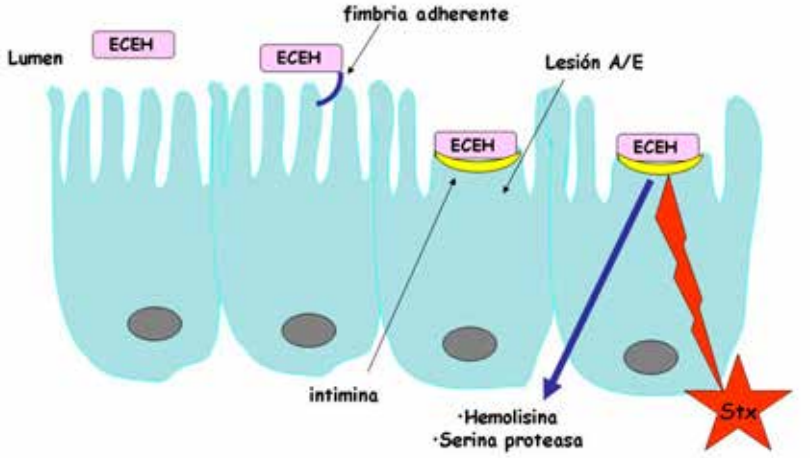


Mecanismo de producción de diarrea por *Escherichia coli* enteroadherente (ECEA).



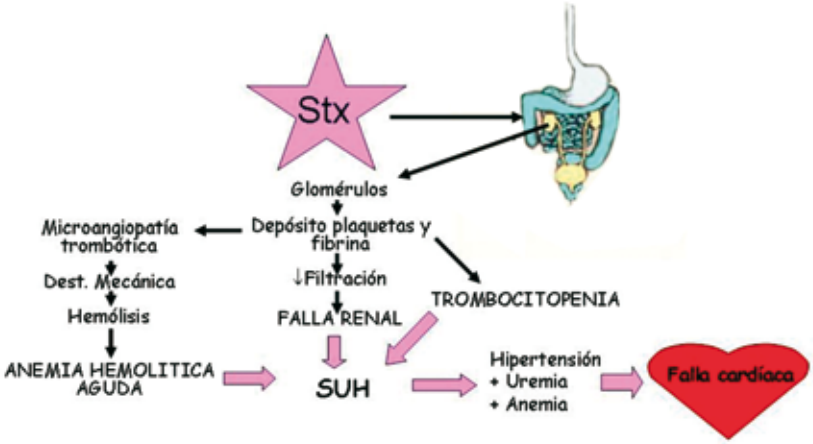


Mecanismo de producción de diarrea por *Escherichia coli* enterotoxigénico (ECET).

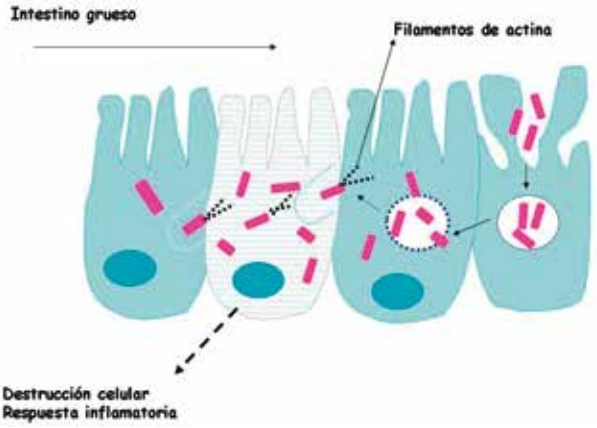


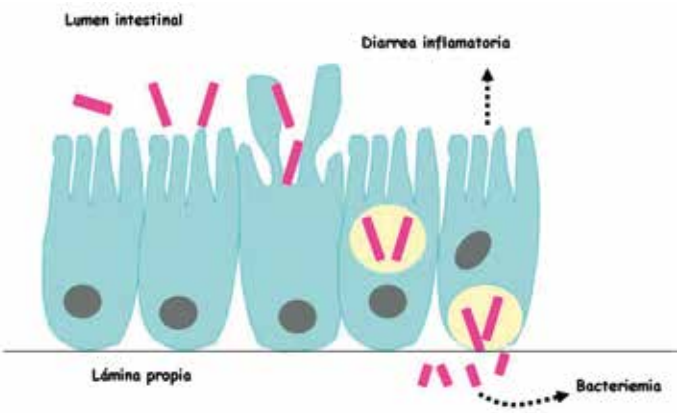
Mecanismo de acción de ECEH.

Signos y síntomas del Síndrome Urémico Hemolitico (SUH).

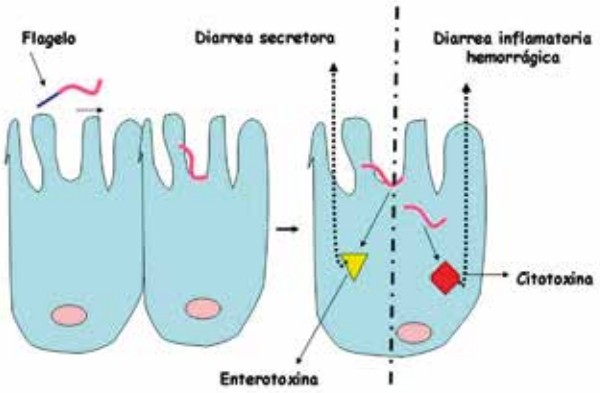


Mecanismo de producción de diarrea por *Shigella* spp.



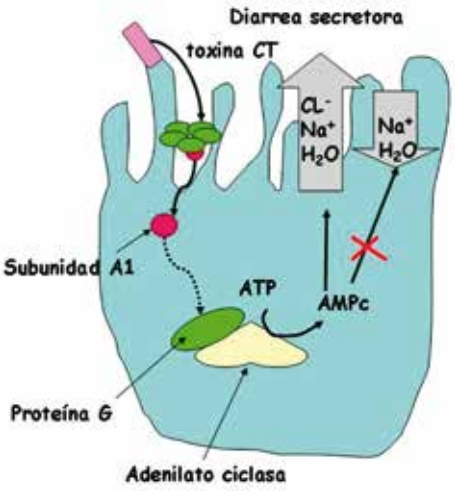


Mecanismo de producción de diarrea por *Salmonella* spp.

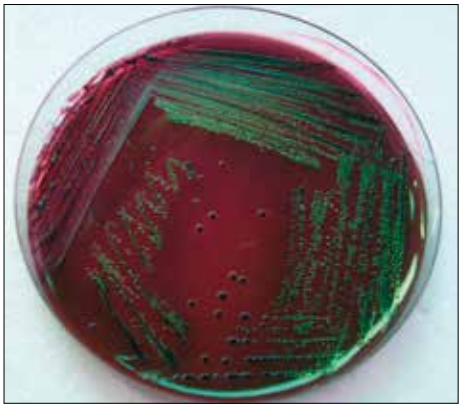


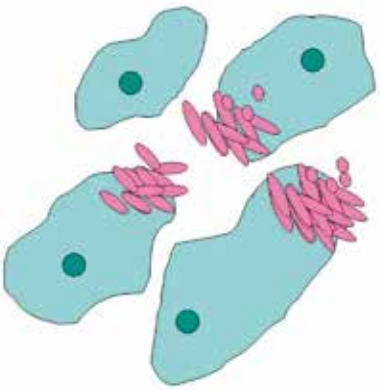
Mecanismos de producción de diarrea por *Campylobacter* spp.

Mecanismo de producción de diarrea por *Vibrio cholerae*.

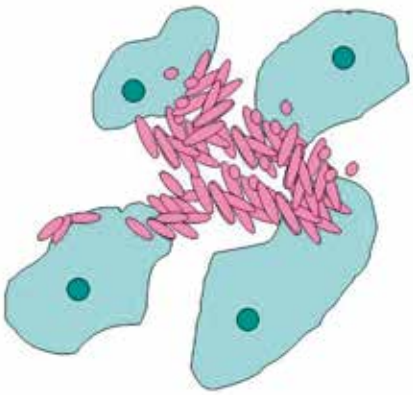


Escherichia coli en EMB.





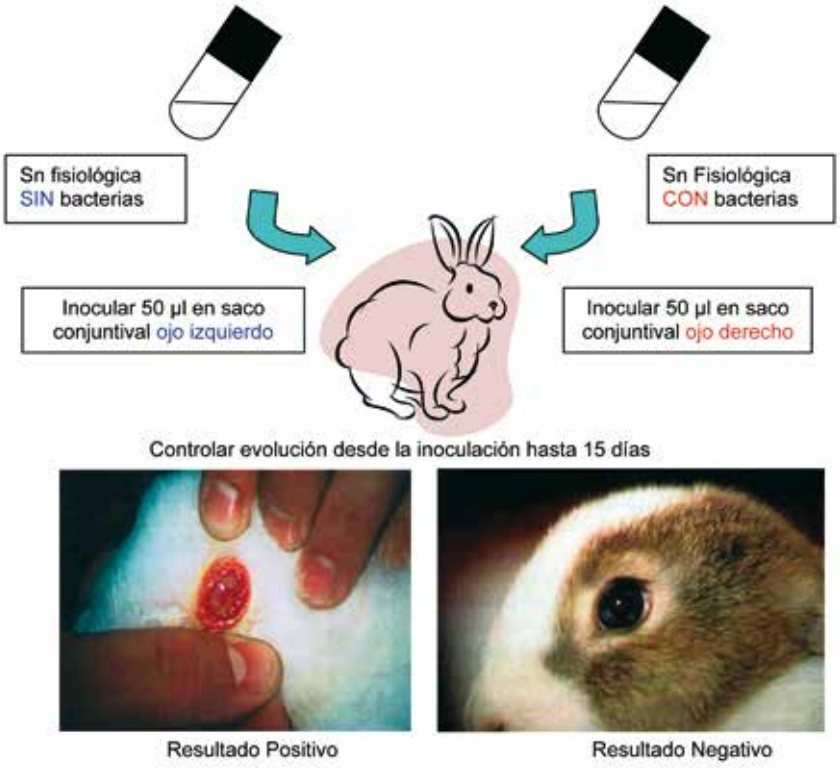
Representación esquemática de adherencia localizada en cultivos celulares.



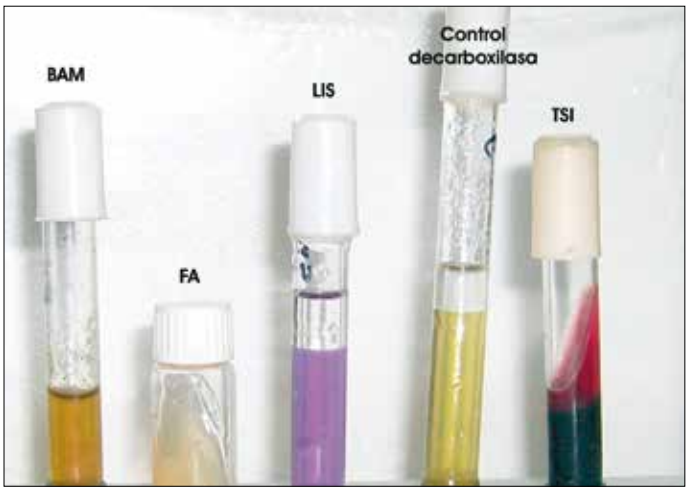
Representación esquemática de adherencia agregativa en cultivos celulares.

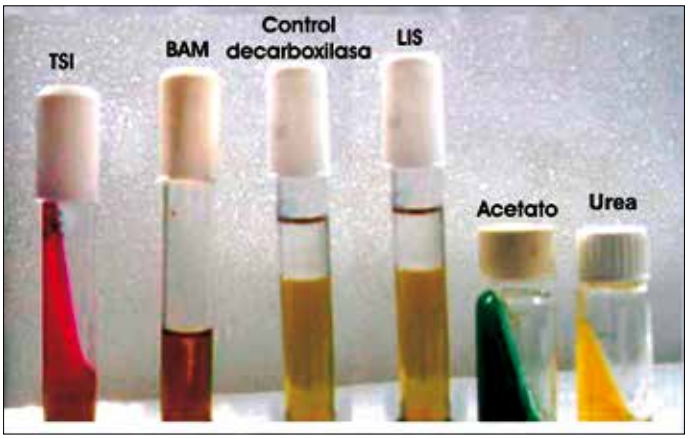
Representación esquemática de adherencia difusa en cultivos celulares.

Test de queratoconjuntivitis en ojo de cobayo (Test de Sereny).



Pruebas bioquímicas típicas de *Salmonella* spp. (BAM: Buenos Aires Medio, FA: Fenilalanina, LIS: Lisina, TSI: agar hierro triple azúcar).





Pruebas bioquímicas típicas de *Shigella* spp. (TSI: agar hierro triple azúcar, BAM: Buenos Aires Medio, LIS: Lisina).

Aeromonas spp. en placa de agar sangre.