







Universidad de la República  
Facultad de Medicina

# Temas de Bacteriología y Virología Médica

3<sup>ra</sup> edición

Departamento de Bacteriología y Virología





## **MENSAJE AL LECTOR...**

La obra que tienes en tus manos es el resultado de un importante trabajo realizado por los estudiantes, tus compañeros, que formamos parte de Oficina del Libro-Fundación de Ediciones de la Facultad de Medicina, Universidad de la República (FEFMUR), órgano oficial de publicaciones de nuestra casa de estudios.

Para que existan libros es necesario el trabajo de nuestros Docentes e Investigadores y de los integrantes de la Fundación, desempeñándonos como Traductores, Correctores, Tipeadores, Diseñadores Gráficos, Dibujantes, Impresores, Vendedores, Cadetes y Encargados de Áreas.

Eres el único destinatario de este esfuerzo que pretende beneficiarte con el conocimiento, y/o hacerte participé de su generación y difusión como integrante de la institución o como autor.

Por ello te recordamos que quien fotocopia o reproduce de cualquier forma y clandestinamente un libro, no respeta el trabajo de sus pares, delinque, colabora a la no existencia de nuevas obras y encarece las ya existentes. Los libros están legalmente protegidos por los derechos de propiedad intelectual y cualquier uso fuera de la legislación vigente sin el consentimiento del autor y el editor es ilegal.

Día a día trabajamos para ti, te invitamos a continuar esta labor, el comienzo es respetarla. La Institución es tuya desde el año 1948, es responsabilidad de todos que continúe.

## **COMPAÑEROS DE OFICINA DEL LIBRO FEFMUR**

© Oficina del Libro FEFMUR

Montevideo, abril de 2008

Edición, impresión y encuadernación: Oficina del Libro FEFMUR

Gral. Flores 2144

Telefax: 924 80 72 | [oflibro@fmed.edu.uy](mailto:oflibro@fmed.edu.uy)

Diseño y armado: Alfonso Ortiz

Ilustraciones: Fernando Machado

Depósito Legal:

Edición impresa al amparo del decreto 218/996

Comisión del Papel

# Autores

ALGORTA, Gabriela

Prof. Agda. Depto. de Bacteriología y Virología

AMORIN, Belén

Ex Ayudante del Depto. de Bacteriología y Virología

ARBIZA, Juan Ramón

Prof. Agdo., Sección Virología, Facultad de Ciencias

BARRIOS, Patricia

Ayudante del Depto. de Bacteriología y Virología

BETANCOR, Laura

Prof. Adj. del Depto. de Bacteriología y Virología

CALVELO, Estela

Ex Ayudante del Depto. de Bacteriología y Virología

CHABALGOITY, Alejandro

Prof. Agdo. Depto. de Desarrollo Biotecnológico

CAMPIONE, José

Técnico de OPS, ex docente del Depto. de Bacteriología y Virología

CORDEIRO, Nicolás

Asistente del Depto. de Bacteriología y Virología

CHIPARELLI, Héctor

Virólogo del Depto. de Laboratorios, MSP

del MONTE, Alicia

Ex Ayudante del Depto. de Bacteriología y Virología

FLORES, Karina

Asistente de Laboratorio Clínico

GADEA, María del Pilar

Asistente del Depto. de Bacteriología y Virología

GROTIUZ, Germán

Ex Asistente del Depto. de Bacteriología y Virología

INGOLD, Elizabet

Ex Ayudante del Depto. de Bacteriología y Virología

LE PERA, Valeria

Ex-Ayudante del Depto. de Bacteriología y Virología

MACEDO, Marina

Prof. Adj. del Depto. de Bacteriología y Virología

MATEOS, Soledad

Asistente del Depto. de Bacteriología y Virología

MATTERA, Alicia

Ex-Asistente del Depto. de Bacteriología y Virología

MOTA, María Inés

Asistente del Depto. de Bacteriología y Virología

PARDO, Lorena

Asistente del Depto. de Bacteriología y Virología

PEREIRA, Marinela

Prof. Adj. del Depto. de Bacteriología y Virología

PIREZ, Catalina

Prof. de Pediatría

RIAL, Analía

Asistente del Depto. de Desarrollo Biotecnológico

RIVAS, Carlos

Responsable de Laboratorio, Com. Honor. para la Lucha Antituberculosa

RODRIGUEZ, Grisel

Prof. Adj. del Depto. de Laboratorio Clínico

SANDIN, Daniela

Ex-Asistente del Depto. de Bacteriología y Virología

SCHELOTTO, Felipe

Prof. del Depto. de Bacteriología y Virología

SEIJA, Verónica

Prof. Adj. del Depto. de Laboratorio Clínico

SIROK, Alfredo

Ex-Ayudante del Depto. de Bacteriología y Virología

TAROCCO, Rosario

Ayudante del Depto. de Bacteriología y Virología

TORRES, María Eugenia

Prof. Adj. del Depto. de Laboratorio Clínico

VARELA, Gustavo

Prof. Agdo. del Depto. de Bacteriología y Virología

VIGNOLI, Rafael

Prof. Agdo. del Depto. de Bacteriología y Virología

VOLA, Magdalena

Asistente del Depto. de Bacteriología y Virología

# Índice general

Autores.....	5
Índice general.....	7
<b>Sección 1   Aspectos generales.....</b>	<b>11</b>
1. Biología viral .....	13
<i>J.R. Arbiza</i>	
2. Morfología y estructura bacteriana .....	25
<i>M.C. Pérez, M.I. Mota</i>	
3. Fisiología y metabolismo bacteriano .....	47
<i>I. Bado, V. García, G. Grotiuz, G. Varela</i>	
4. Genética bacteriana .....	63
<i>L. Betancor, M. P. Gadea, K. Flores</i>	
5. Métodos de estudio de bacterias y virus.	
Métodos diagnósticos .....	89
<i>D. Ruchansky, G. Algorta, D. Sandín</i>	
6. Interacciones huesped-parásito. Infección y enfermedad.	
Flora normal .....	111
<i>M. P. Gadea, M. E. Torres</i>	
7. Inmunidad contra los agentes infecciosos .....	129
<i>A. Rial, M. Pereira, J. Chabalgoity</i>	
<b>Sección 2   Principales procesos infecciosos .....</b>	<b>147</b>
8. Infecciones de piel y partes blandas .....	149
<i>L. Pardo, G. Varela, M. Vola</i>	
9. Infecciones respiratorias .....	161
<i>S. Mateos, L. Pardo, M. Macedo</i>	
10. Gastroenteritis .....	185
<i>M.B. Amorín, M.P. Gadea, S. González, M.I. Mota , F. Schelotto</i>	
11. Infección urinaria .....	213
<i>A. Mattera, M. Parada, M.E. Torres, V. Machado</i>	
12. Bacteriemias y sepsis. Endocarditis .....	223
<i>G. Algorta, L. Pardo, M. Macedo, M. Vola</i>	
13. Infecciones del sistema nervioso central .....	239
<i>S. Mateos, C. Pérez, L. Robino</i>	

<b>14.</b> Infecciones de transmisión sexual.....	269
<i>L. Anzalone, A. Mattera</i>	
<b>15.</b> Infecciones hospitalarias y asociadas a cuidados de la salud .....	287
<i>M. Macedo, R. Taroco</i>	
 <b>Sección 3   Etiopatogenia.....</b>	<b>301</b>
<b>16.</b> Género <i>Staphylococcus</i> .....	303
<i>V. Machado, L. Pardo, V. Seija</i>	
<b>17.</b> Géneros <i>Streptococcus</i> y <i>Enterococcus</i> .....	319
<i>G. Rodríguez</i>	
<b>18.</b> Principales grupos de bacilos y cocos Gram negativos exigentes.....	339
<i>P. Hitateguy, M.E. Torres</i>	
<b>19.</b> Principales grupos de bacilos gram negativos no exigentes .....	369
<i>F. Schelotto, G. Alcorta</i>	
<b>20.</b> Principales grupos de bacilos gram positivos aerobios.....	395
<i>M. Macedo, M. Vola</i>	
<b>21.</b> Bacterias anaerobias.....	411
<i>C. Rivas, M.I. Mota</i>	
<b>22.</b> Micobacterias.....	437
<i>M.P. Gadea, S. González, G. Rodríguez</i>	
<b>23.</b> Chlamydia, mycoplasma y rickettsia .....	469
<i>V. Le Pera</i>	
<b>24.</b> Leptospira .....	485
<i>S. González, A. del Monte, F. Schelotto, R. Taroco</i>	
<b>25.</b> Virus respiratorios .....	505
<i>S. Mateos</i>	
<b>26.</b> Retrovirus. Virus de la inmunodeficiencia humana.....	525
<i>N. Cordeiro, R. Taroco, D. Ruchansky</i>	
<b>27.</b> Virus de las hepatitis.....	559
<i>N. Cordeiro, R. Taroco, H. Chiaparelli</i>	
<b>28.</b> Enterovirus .....	599
<i>I. Bado, V. García, D. Sandín, G. Rodríguez</i>	
<b>29.</b> Agentes virales de gastroenteritis. Rotavirus .....	607
<i>A. Sirok, D. Sandín, V. Le Pera</i>	
<b>30.</b> Herpesvirus.....	623
<i>A. Mattera, P. Barrios</i>	

<b>31.</b> Agentes de infecciones emergentes, hantavirus, dengue, BSE .....	655
A. del Monte, E. Calvelo, E. Ingold, F. Schelotto, H. Chiparelli, J. Campione, R. Vignoli	
<b>Sección 4   Control de poblaciones microbianas</b> .....	681
<b>32.</b> Inmunoprofilaxis. Vacunas .....	683
P. Barrios, P. Hitateguy, L. Robino, L. Betancor	
<b>33.</b> Esterilización, desinfección y antisepsia.....	703
R. Vignoli	
<b>34.</b> Principales grupos de antibióticos.....	725
I. Bado, N. Cordeiro, V. García, L. Robino, V. Seija, R. Vignoli	
<b>35.</b> Principales mecanismos de resistencia antibiótica.....	751
I. Bado, V. García, L. Robino, N. Cordeiro, V. Seija, R. Vignoli	
<b>36.</b> Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica .....	763
L. Robino, V. García, J. Bado, N. Cordeiro, V. Seija, R. Taroco, R. Vignoli	
<b>37.</b> Antivirales .....	773
S. Mateos	



## SECCIÓN 1

# Aspectos generales

1. Biología viral
2. Morfología y estructura bacteriana
3. Fisiología y metabolismo bacteriano
4. Genética bacteriana
5. Métodos de estudio de bacterias y virus. Métodos diagnósticos
6. Interacciones huésped parásito. Flora normal
7. Inmunidad contra los agentes infecciosos

>>



# 1

# Biología viral

*J.R. Arbiza*

## INTRODUCCIÓN

Hasta fines del siglo XIX se había avanzado en la etiología de muchas enfermedades infecciosas; sin embargo, quedaban muchas enfermedades en el hombre, animales y plantas, en las cuales no se identificaba un microorganismo causal. En el siglo XX, se descubrieron los virus como causantes de enfermedades infecciosas para las cuales no se había encontrado una bacteria, un hongo, o un protozoario como responsable. Fue el desarrollo de nuevas técnicas como los cultivos celulares, el avance en la microscopía, y el advenimiento a fines del siglo XX de técnicas de biología molecular, que han permitido aislar e identificar los virus. Además, han permitido un avance extraordinario en el conocimiento molecular de la biología de los mismos.

Sin embargo, los virólogos tienen un doble desafío para el futuro; controlar los virus que ya se conocen, para los cuales no existen fármacos o vacunas efectivas hasta el momento, y aislar, identificar, caracterizar, y controlar los virus emergentes o reemergentes (virus de la inmunodeficiencia humana, Ébola, Hantavirus, etc.).

## CARACTERÍSTICAS GENERALES

Las primeras características que diferenciaron a los virus de otros microorganismos fueron: el tamaño, estimado por su capacidad de atravesar filtros que retienen a las bacterias, y la incapacidad para reproducirse en medios biológicos inertes como medios de cultivo para bacterias, requiriendo para su propagación de animales o cultivos celulares. Hoy se sabe que estas características no alcanzan para diferenciar a los virus de otros agentes biológicos, dado que existen bacterias cuyo tamaño puede ser similar al de los virus más grandes, y algunas bacterias como *Chlamydias* y *Rickettsias*, son parásitos intracelulares obligatorios.

La organización y composición de las partículas virales, ofrecen características que los diferencian de otros microorganismos. Los virus poseen un solo tipo de ácido nucleico de pequeño tamaño con respecto a otros agentes biológicos, rodeado por una cáscara o cápside, formada por numerosas copias de una proteína, o de un número limitado de ellas. Algunos grupos de virus presentan por fuera de la cápside, una envoltura lipídica de origen celular en la que se insertan glicoproteínas. No presentan sistemas enzimáticos propios, por lo tanto no son capaces de replicarse por sí solos, y requieren de células animales, vegetales o bacterias para cumplir su ciclo de reproducción; esto define su parasitismo celular obligatorio.

Este tipo de reproducción particular que tienen los virus, es la característica que justifica su lugar en la escala biológica. A diferencia de las células, en el momento de su multiplicación, los virus no aumentan de tamaño para su posterior división, por el contrario, la partícula viral se desintegra y luego se sintetizan cada uno de sus componentes, que se reúnen por ensamblaje. Esta forma de multiplicación en la cual se producen réplicas del virus progenitor, es conocida con el nombre de replicación viral, y se diferencia del proceso de división celular usado por células procariotas y eucariotas.

Se pueden citar dos definiciones de virus. La primera propuesta por Lwoff (1957): “entidad estrictamente celular y potencialmente patogénica con una fase infecciosa. Posee un solo tipo de ácido nucleico, es incapaz de crecer y reproducirse por fisión binaria, y carecen de enzimas para producir energía”. La segunda, pertenece a Luria y Darnell (1967): “los virus son entidades cuyo genoma se replica dentro de células vivas, usando su maquinaria de síntesis. Esto determina la formación de elementos especializados, que permiten la transferencia del genoma viral a otras células”.

### **Viroídes**

Son virus simples constituidos por ácido ribonucleico (RNA) circular de muy bajo peso molecular, sin cápside protectora. Producen enfermedades hasta el momento conocidos exclusivamente en plantas.

### **Provirus**

El genoma viral se puede integrar al genoma celular por un proceso de recombinación genética, directamente en los virus DNA, o previa transcripción inversa en los virus RNA. El genoma viral integrado al celular recibe el nombre de provirus.

### **Priones**

Ciertos agentes causantes de afecciones degenerativas del sistema nervioso central del hombre, han sido clasificados como virus no convencionales, dado que no ha sido posible determinar una estructura similar a la de los virus en el material infectante, ni el tipo de ácido nucleico de dichos agentes. Son extremadamente resistentes a sustancias que inactivan los virus comunes. Algunos autores han propuesto que corresponderían a viroides patógenos del hombre.

Los priones han sido descritos en los últimos años, como causantes de muchas enfermedades del sistema nervioso, comentadas anteriormente, principalmente el scrapie en el ganado ovino, y la encefalopatía espongiforme bovina (B.S.E.), o comúnmente conocida como síndrome de la “vaca loca”. En el hombre serían los agentes relacionados con la enfermedad de Creutzfeld-Jacob y Kuru.

Son estructuralmente más simples que los virus, y están formados solo por proteínas. Cuando se descubrieron, parecía que se podía producir una gran revolución en el conocimiento de la biología, porque la idea de que una proteína pudiera autorreplicarse, sería opuesta al dogma central de que la información genética es transmitida desde el ácido nucleico a la proteína. El hallazgo de los priones y el avance en el conocimiento de su biología, podrán dilucidar muchas enfermedades aún sin resolver. Muchas son las investigaciones que se realizan en estos momentos, y las hipótesis propuestas para explicar la biología y permanencia de estas proteínas, extremadamente resistentes a sustancias que inactivan a los virus comunes.

## MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA DE LOS VIRUS

### Tamaño y forma

Existe gran variedad de tamaño y forma de los virus hasta hoy estudiados. Se puede observar un tamaño entre 28 nm en los virus más pequeños denominados picornavirus (pico de pequeño), hasta 300 nm en los virus más grandes que se conocen, como son los poxvirus (ver figura 1.1).

La forma también es muy variada, pudiéndose observar formas icosaédricas o helicoidales en virus que no tienen envoltura por fuera de la cápside, hasta formas esféricas, filamentosa o pleomórficas en los virus con envoltura o muy complejos como el virus de la rabia (ver figuras 1.2 y 1.6).

### Estructura

Como ya se mencionó la estructura de un virus está basada en su simplicidad. A pesar de esto, existe cierta diversidad que es usada para la clasificación de estos microorganismos.

### Virus desnudos

La estructura de los virus más simples está compuesta por un solo tipo de ácido nucleico (DNA o RNA), rodeado de una cáscara proteica que se denomina cápside (del griego capsu que significa caja). De la reunión de las subunidades proteicas codificadas por el genoma viral, que se ensamblan según principios geométricos, se forman diferentes tipos de simetrías, icosaédrica o helicoidal (ver figura 1.2 y 1.3b) Esta estructura

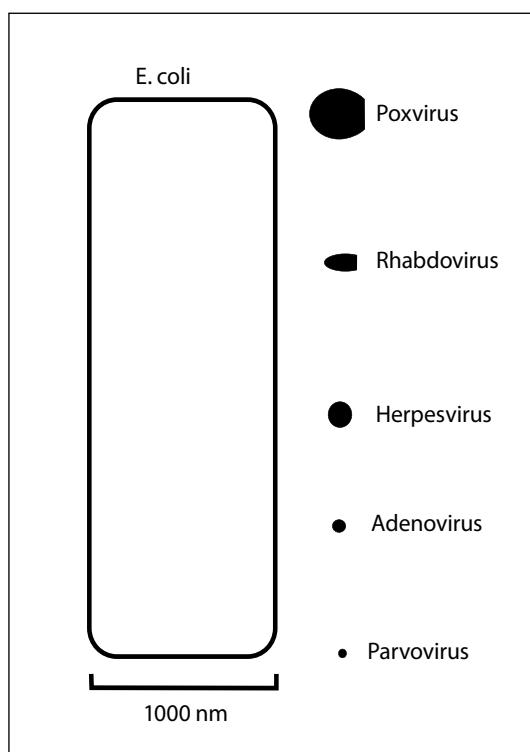
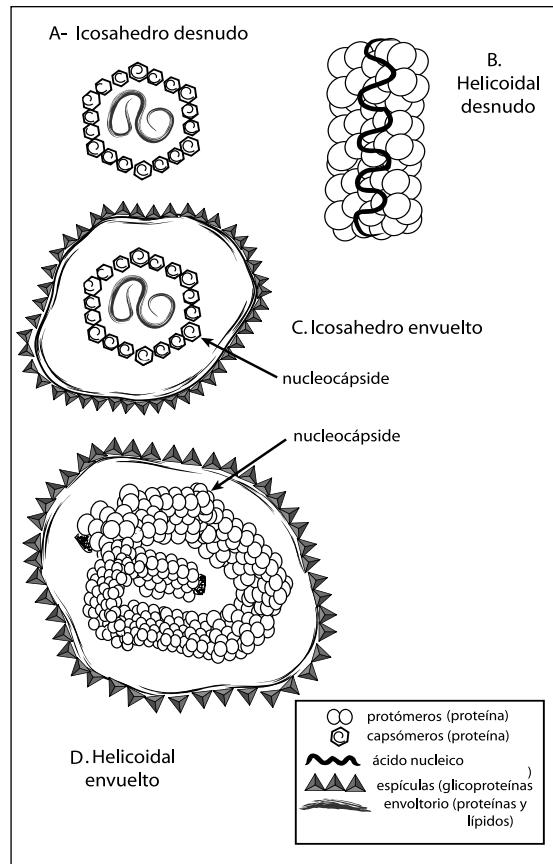


Figura 1.1

**Figura 1.2.**

básica de ácido nucleico y cápside, recibe el nombre de nucleocápside, y constituye en los virus desnudos la partícula viral completa o virus. Ésta se diferencia del término virión, que es usado para las partículas virales o virus potencialmente infecciosas.

Cuando se observa al microscopio electrónico una cápside viral, pueden observarse estructuras morfológicas denominadas capsómeros, que resultan de la unión por enlaces de las subunidades proteicas. La forma de distribución de los capsómeros así como el número de ellos, depende de cada tipo de virus.

### **Virus envueltos**

La estructura de las partículas virales de los virus denominados envueltos, está formada además de la nucleocápside, por una envoltura de origen celular que la rodea (ver figuras 1.2 y 1.3a). Dicha envoltura se obtiene en el proceso de liberación por gemación (brotamiento), como se esquematiza en la figura 1.4. En ésta se insertan glicoproteínas de origen viral, que reciben el nombre de espículas o glicoproteínas de superficie, y que tienen un papel importante en el reconocimiento de receptores específicos de la superficie celular, durante el paso inicial de relación con la célula huésped para la multiplicación viral.

### **Ácidos nucleicos**

El ácido nucleico que lleva la información genética y que constituye el genoma viral, puede tener varias formas. Como ya se mencionó, una partícula viral tiene en su es-

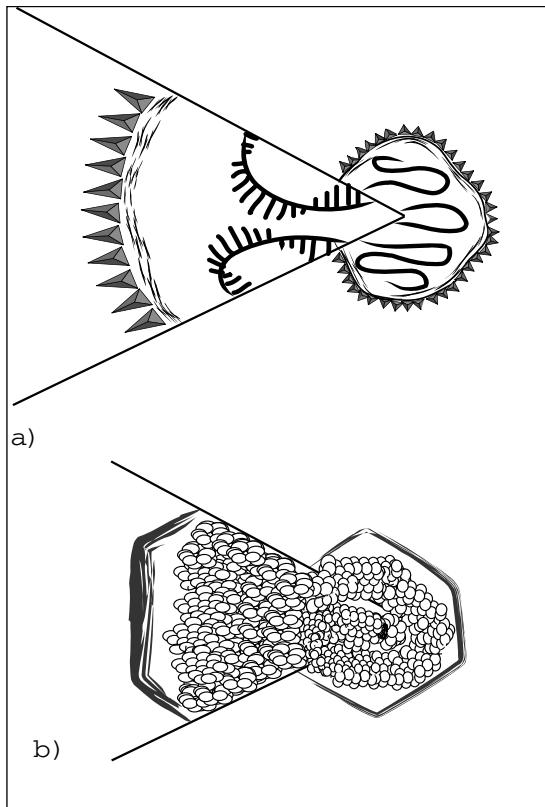


Figura 1.3.

tructura un solo tipo de ácido nucleico (DNA o RNA), pero la forma de estos puede ser de doble o simple cadena, segmentado o no, circular o lineal, determinando una gran diversidad de utilidad en la taxonomía viral (ver figura 1.5).

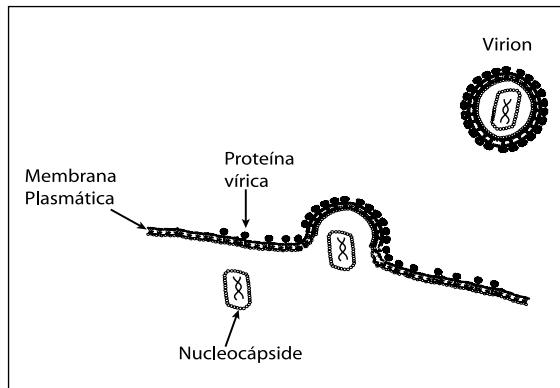
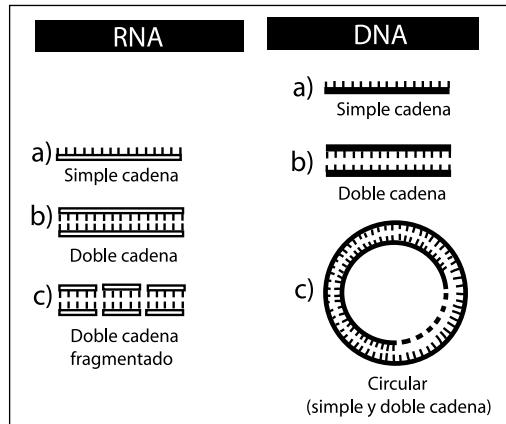
En la figura 1.6, se representa un cuadro con los principales virus animales, con sus diferentes estructuras (con envoltura o sin ella, con simetría helicoidal o icosaédrica) y la composición del ácido nucleico. Estas dos características se combinan de diferentes maneras para determinar varios grupos de virus.

## MULTIPLICACIÓN VIRAL

Una partícula viral puede encontrarse en dos estados: activa o inactiva. Para demostrar el estado inactivo, basta incluir una suspensión de virus en un medio de cultivo, y observar que son incapaces de cumplir actividades metabólicas necesarias para su multiplicación. Se deduce de ello, que los virus carecen como ya se mencionó anteriormente, de maquinaria enzimática que les permita autorreplicarse, aún cuando se les brinde nutrientes que serían adecuados para la propagación de las bacterias más exigentes.

Pero si una partícula viral es incorporada a células vivas sensibles, se comporta en forma activa, y por lo tanto tomará el comando de la maquinaria enzimática de la célula huésped, logrando así su replicación.

La multiplicación de los virus animales, vegetales y bacteriófagos, es similar en sus principios, pero cada una de ellas tiene sus particularidades. Esto se basa principalmente en las diferencias entre las células que infectan.

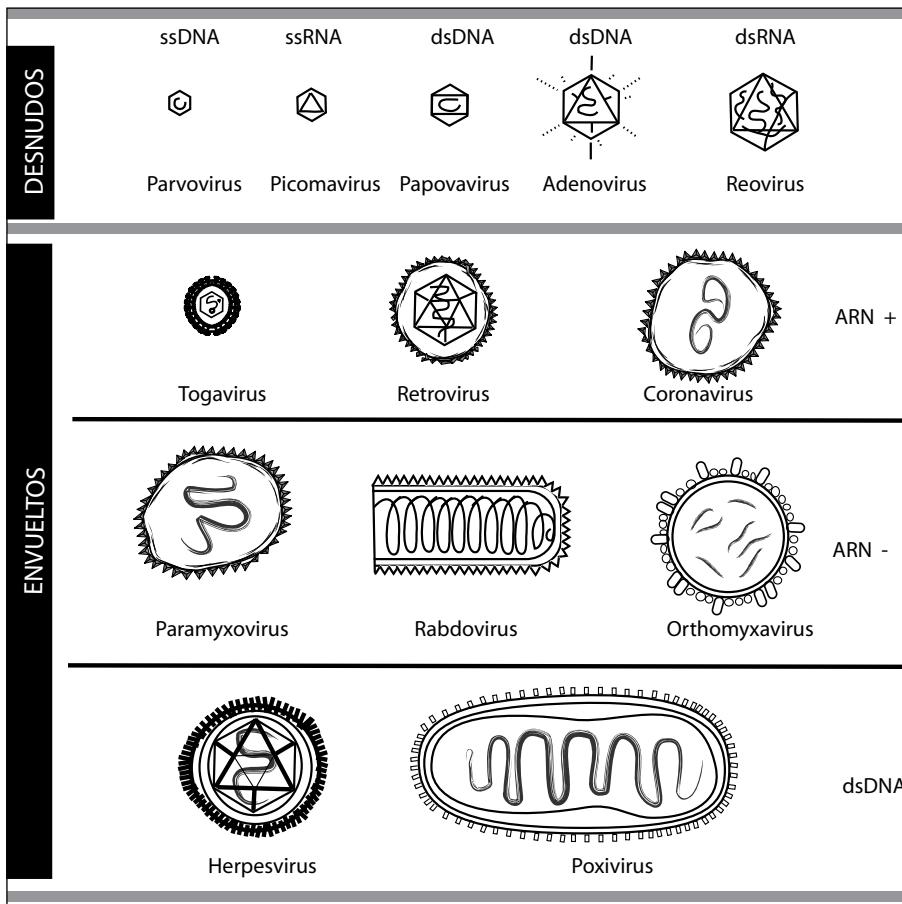
**Figura 1.4.****Figura 1.5.**

El desarrollo del conocimiento sobre la multiplicación de los virus animales, ha sido posible por el uso en el laboratorio, de muchos sistemas de aislamiento de virus en los cuales se puede estudiar el proceso de multiplicación viral. En un principio fueron animales y huevos embrionados los sistemas más usados, pero actualmente se han sustituido por cultivos celulares, que ha favorecido el conocimiento de las etapas de la multiplicación viral. Existe una gran variedad de cultivos de células, cultivos primarios o líneas celulares, que pueden ser subcultivadas indefinidamente. Dichas líneas se asemejan mucho a las células transformadas, debido a su gran potencial de crecimiento y a su aneuploidía. Habitualmente se las usa para aislar virus, pero no se recomiendan para la producción de vacunas virales humanas, dado que los virus propagados en esas líneas pueden adquirir características genéticas oncovírgenes. Los cultivos primarios, resultan de la dispersión de células diploides de un tejido, por digestión enzimática de la sustancia intercelular. También son poco recomendadas para la producción de vacunas, ya que pueden tener virus latentes propios de la especie de la que provienen. Los embriones de gallina y sus anexos siguen siendo muy usados, porque ofrecen diferentes tipos celulares, a los que se puede llegar por diferentes vías (intra-amniótica, intra-alantoidea, en saco de yema, etc.).

### Infección viral

La infección viral puede ser productiva, o en oposición abortiva. Esta última cumple un ciclo incompleto en el que no se forman partículas virales infecciosas.

Figura 1.6.

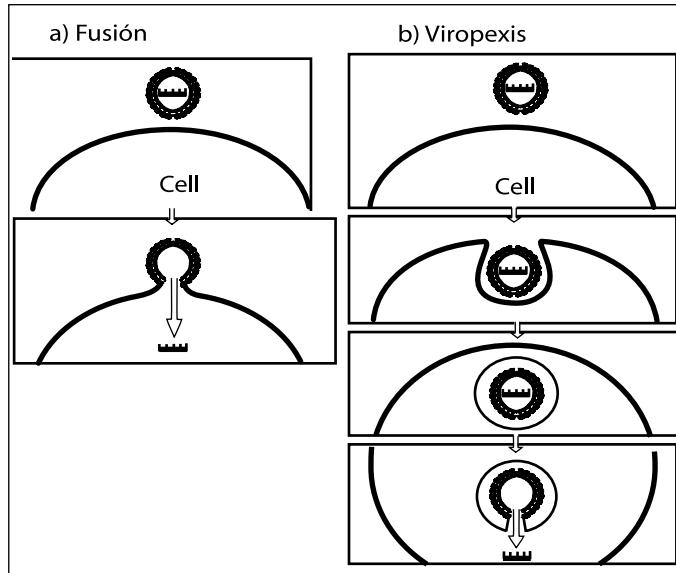


Una infección productiva, culmina con la generación de una progenie viral infecciosa. Este proceso requiere una serie de pasos o etapas, que son diferentes en los distintos tipos de virus. Las etapas fundamentales de la infección viral son: adsorción, penetración, denudación, eclipse, replicación, maduración y liberación.

### Adsorción

En la adsorción intervienen muchos factores. En principio existe una atracción por fuerzas iónicas. Dado que a pH neutro los virus y las células tienen cargas negativas, para que exista atracción son necesarios iones positivos. Dicho requerimiento lo cumplen los iones de magnesio.

Otro factor importante en esta etapa, es la interacción de sitios específicos de la partícula viral con receptores celulares específicos. Esto determina la especificidad de algunos virus para crecer en células de origen específico; por ejemplo el virus de la poliomielitis solo puede crecer en células humanas y de primates. Otros virus presentan estructuras en su superficie que les permiten cumplir con esta etapa de forma muy especializada. Estas estructuras son glicoproteínas, que reconocen receptores celulares específicos. Hoy se pueden aislar esos elementos como complejos virus y célula.

**Figura 1.7.**

Luego de adsorbidos a una célula, los virus pueden ser recuperados conservando sus caracteres de partícula libre, potencialmente infectante. Los poliovirus, pueden ser separados de las células con soluciones salinas a altas concentraciones, o con detergentes; los mixovirus (virus de la gripe), que usan también una estructura especializada, se separan de las células huéspedes por acción de la enzima neuraminidasa.

### **Penetración**

La penetración de los virus una vez adsorbidos, puede realizarse de diferentes maneras, por: viropexis, penetración o fusión (ver figura 1.7).

#### **VIROPEXIS**

Es un proceso de fagocitosis, en el que se produce una invaginación de la membrana plasmática; así el virus queda englobado en una vesícula dentro del citoplasma celular. Es el mecanismo más común de penetración de los virus.

#### **PENETRACIÓN**

En algunos virus, la penetración acontece por simple cruce de la membrana plasmática; así la partícula viral queda directamente incluida en el citoplasma.

#### **FUSIÓN**

Otro tipo de penetración se da por fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática. También en este caso el virus es directamente incorporado al citoplasma.

#### **Denudación y eclipse**

En esta etapa el virus se desintegra, dejando libre su ácido nucleico que comanda su propia replicación, además de la síntesis de las proteínas necesarias para integrar nuevas partículas.

La manera en la que un virus pierde la cápside y su envoltura si la tiene, es característico de cada grupo viral. En los poliovirus parece existir una integración con los

constituyentes celulares tales como los receptores. En otros virus como los poxvirus y los reovirus, el proceso es más complejo. Los poxvirus pierden parte de su envoltura en las vacuolas fagocíticas, mientras que un RNA mensajero (RNAm) es sintetizado por una transcriptasa, que termina con la producción de una enzima nueva que completa la denudación. Los reovirus penetran en los lisosomas donde las enzimas proteolíticas eliminan la cápside, y promueven la transcripción del genoma.

Los fenómenos descritos (adsorción, penetración y denudación) finalizan con la desintegración de las partículas virales, pero no siempre el proceso progresá hasta la replicación viral. Si interrumpimos el ciclo en esta etapa llamada eclipse, el ácido nucleico liberado de sus envolturas puede recobrarse por disrupción de la célula huésped, pero habría perdido su capacidad de infectar (algunos autores opinan que aún puede recobrarse intacto). Si el proceso normal continúa, comienza la replicación del ácido nucleico y la síntesis de las proteínas estructurales y no estructurales, necesarias para la producción de virus.

### Replicación del ácido nucleico

La replicación es un fenómeno muy heterogéneo porque existe mucha variedad de ácidos nucleicos de origen viral; los hay de DNA y de RNA, de una o dos hebras, segmentados o no, etc. Siempre el genoma viral es el elemento capaz de gobernar su auto-replicación, y de transmitir la información estructural y funcional a la progenie resultante de una infección. No obstante la diversidad señalada, en la replicación intervienen elementos comunes que vale la pena destacar, tales como la formación de un RNAm, capaz de traducir en el ribosoma celular las proteínas codificadas por el genoma viral. Además, sea cual sea el ácido nucleico, siempre se diferencian dos conjuntos de genes, los precoces y los tardíos. Los primeros serían los encargados de codificar proteínas necesarias para la copia de la molécula de ácido nucleico, y los tardíos serían los encargados de codificar las proteínas estructurales y las proteínas para el ensamblaje.

La replicación puede producirse en el núcleo o en el citoplasma de la célula, dependiendo del tipo de ácido nucleico que constituya el genoma viral. Los virus que contienen RNA se replican en el citoplasma, mientras que los que tienen DNA se replican en el núcleo; excepto el virus de la viruela, que aunque son virus DNA, su replicación se realiza en el citoplasma.

Los virus DNA sintetizan RNAm por medio de una polimerasa, y éste pasa al citoplasma donde se producirá la síntesis proteica. De estas proteínas algunas tienen funciones estructurales, y formarán los capsómeros que al unirse entre sí, constituirán la cápside. Otras proteínas tendrán funciones enzimáticas, de polímeros, y se introducirán en el ácido nucleico promoviendo la replicación del DNA viral. El tipo de replicación es semiconservativa, y los intermediarios replicativos serán lineales o cílicos, dependiendo si la molécula de DNA es lineal o cíclica respectivamente.

Como ejemplo de virus DNA podemos citar al grupo de los herpesvirus, quienes pierden la cápside en el citoplasma, y penetran al núcleo iniciando la replicación del ácido nucleico. En el núcleo se realiza la síntesis de RNAm inducida por el virus, y encontramos enzimas relacionadas a la síntesis, y fragmentación del DNA. Los pasos biosintéticos descritos pueden relacionarse con el desarrollo de cuerpos de inclusión nucleares, y la formación de partículas virales.

Los virus RNA generan un interés especial, por la diversidad de formas de replicación que presentan; esto depende de que el RNA pueda actuar como mensajero,

lo que se denomina RNA de polaridad positiva. De lo contrario, al RNA que posea la secuencia de bases complementarias a las del RNAm, se le denomina de polaridad negativa.

Cuando consideramos un RNA con polaridad positiva, éste actúa como mensajero entrando en el ribosoma celular, e iniciando una traducción de polimerasas, necesarias para iniciar la replicación del ácido nucleico. Luego actuará la parte tardía del RNA traduciendo proteínas para la formación de la cápside, y ensamblaje de la partícula viral. Un ejemplo de este tipo de replicación son los poliovirus, que tienen como genoma un RNA de hebra única, con ácido poliadenílico en un extremo. Dicho ácido sirve inicialmente como molécula de RNAm, para la síntesis de replicasa de RNA. Se produce así, el intermediario replicativo de RNA, útil para la síntesis de moléculas de RNA virales de los descendientes. La replicación del RNA viral, es independiente de las síntesis de DNA de la célula huésped.

Por el contrario, si el RNA es de polaridad negativa, la molécula no tiene función mensajera, y por lo tanto sintetiza una molécula complementaria a la original con función mensajera, que entra al ribosoma. En este grupo de virus aparece un nuevo concepto en la estructura viral, porque para sintetizar una copia se necesita una transcriptasa RNA dependiente, que no se encuentra en las células. Por consiguiente, en estos virus además del genoma y las proteínas estructurales, son sintetizadas otras proteínas que luego serán incorporadas a la partícula viral.

### **Maduración y liberación**

Hay virus cuya única cubierta es la cápside, virus desnudos, en oposición a los que poseen envoltura por fuera de la cápside, virus envueltos. Es conveniente considerarlos por separado en esta etapa, que es la finalización de la formación de una progenie viral.

Para los virus desnudos, el fenómeno de maduración consiste en la unión de los capsómeros para formar la cápside, y la posterior unión de ésta con el genoma. Parece existir una diferencia en la maduración de este grupo de virus, dependiendo si el ácido nucleico del genoma es DNA o RNA. Para los primeros, la síntesis del DNA se realiza con anticipación a la aparición de los elementos estructurales, mientras que para los segundos, se ha demostrado con aminoácidos radioactivos, que las cadenas polipeptídicas se reúnen rápidamente en capsómeros y éstos en cápside. Además se destaca que existe concordancia con la síntesis de la molécula de RNA.

La liberación en este grupo de virus depende mucho del tipo de virus, y de las características de la célula huésped. Los poliovirus son liberados rápidamente de las células HeLa o HEp-2; dicha liberación se realiza por rotura de vacuolas superficiales. En los virus DNA que maduran en el núcleo, el tiempo de liberación es mayor que en el ejemplo anterior, porque la liberación se produce por autolisis celular.

En los virus con envoltura, la maduración es más compleja (ver 1.4). Además de la unión del ácido nucleico con la cápside, el virus debe rodearse de la envoltura. Luego de haberse formado la cápside, la partícula se approxima a la membrana plasmática, se produce la evaginación de la membrana, y luego el desprendimiento del brote. El brotamiento puede ser explicado por relación entre las proteínas de la membrana plasmática y la nucleocápside. Generalmente, la liberación de la partícula se produce al finalizar el brotamiento de la membrana celular.

## Alteraciones celulares producidas por infección viral

Las células pueden responder de diferentes formas ante una infección viral: sin alteración aparente; con efecto citopático, es decir muerte de la célula por lisis celular e hiperplasia como en los poxvirus; o solo con hiperplasia, como en la transformación viral en células malignas.

### Efecto citopático

El efecto citopático consiste en alteraciones morfológicas de las células, que resultan en la muerte celular. Este efecto es diferente dependiendo el tipo de virus. En cultivos infectados con adenovirus, las células se redondean y se agrupan como un racimo de uvas. En cambio, las células infectadas con poliovirus también se redondean, pero se retraen y se lisan liberando muchos virus. El virus sincicial respiratorio, produce fusión de las membranas celulares, originando grandes sincios.

### Cuerpos de inclusión

Los cuerpos de inclusión son acúmulos intracelulares de material nuevo. Algunos se producen por acumulación de viriones o de subunidades virales no reunidas. Estos cuerpos de inclusión pueden romper la estructura celular, o cambiar la función y producir la muerte celular. Otros corpúsculos pueden desarrollarse en lugares donde existe síntesis viral, pero no tienen viriones detectables; por ejemplo los corpúsculos eosinófilos intranucleares en las células infectadas por virus del herpes simple.

### Transformación celular

Algunos virus son productores de tumores o de leucemia. Pueden presentar muchos efectos en las células, como la estimulación de la síntesis de DNA celular (virus del polioma), alteraciones de la superficie evidenciadas por especificidades antigenicas nuevas (distintas de aquellas pertenecientes a las subunidades de los viriones), aberraciones cromosómicas y alteraciones del crecimiento celular. Este cambio de una célula normal a una maligna, ha sido llamado transformación.

## BIBLIOGRAFÍA

- Davis B, Dulbecco R, Ginsberg H. Microbiología. 3ra ed. Brasil, San Pablo: Harper and Row; 1985.
- Fields B, Knipe D. Virology 2<sup>a</sup> ed. New York: Raven Press: 1990.
- Joklik WK, Willett H P, Amos DB, Wilgert CM, Zinsser editores. Microbiología. 20<sup>a</sup> ed. BsAs: Panamericana; 1994.



## 2

# Morfología y estructura bacteriana

*M.C. Pérez, M.I. Mota*

## INTRODUCCIÓN E IMPORTANCIA DEL TEMA

En las últimas décadas se han hecho importantes avances en el estudio de la ultraestructura bacteriana, lográndose una identificación bioquímica de muchas fracciones subcelulares; estos avances han permitido ubicar a las bacterias en el reino *Prokaryotae*.

El conocimiento de las diferentes estructuras y composición, ha permitido comprender como muchas bacterias se relacionan con el hombre, ya sea como integrantes de la flora normal o como agresoras para el mismo.

El descubrimiento de que muchas estructuras bacterianas bien identificadas son inmunógenos importantes, permitió el desarrollo de vacunas que han sido verdaderos avances en la medicina de los últimos años. Ejemplo de ello son las vacunas contra microorganismos causantes de meningoencefalitis supurada como *Haemophilus influenzae* tipo b, y *Neisseria meningitidis* (meningococo) A, B y C.

El conocimiento de la composición bioquímica de las diferentes estructuras bacterianas, junto al conocimiento del metabolismo bacteriano, permite hoy la comprensión del mecanismo de acción de los diferentes antibióticos.

Recientemente, los avances de la genética bacteriana hicieron posible el desarrollo de técnicas de biología molecular, con aplicaciones a nivel de la investigación científica y el diagnóstico.

La observación al microscopio óptico con distintas coloraciones y de los cultivos bacterianos, tienen un rol importante en la identificación de las bacterias y su ubicación taxonómica.

## DEFINICIÓN Y UBICACIÓN TAXONÓMICA

Las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria. La mayoría son de vida libre, a excepción de algunas que son de vida intracelular obligada, como *Chlamydias* y *Rickettsias*. Cuentan con los mecanismos productores de energía y el material genético necesarios para su desarrollo y crecimiento.

Las bacterias integran el reino *Prokaryotae* (pro: primitivo y karion núcleo).

Todos los organismos vivos se pueden dividir en dos tipos celulares: eucariotas y

procariotas. Tienen estructuras en común como la membrana celular, los ribosomas encargados de la síntesis proteica, y el ácido desoxirribonucleico (DNA) portador de la información genética. Los organismos multicelulares, animales y plantas, están constituidos por células eucariotas (eu de verdadero). Los protistas, los hongos y las algas que se organizan de forma unicelular, multicelular o en colonias (como los protistas), también poseen células eucariotas.

Dentro de este esquema, las bacterias son microorganismos unicelulares procariotas. En este reino, según criterios evolutivos, diferenciamos el grupo de las eubacterias, y el de las arqueobacterias. Este último comprende bacterias sin peptidoglicano, como las anaerobias que viven en condiciones ácidas calientes, las que viven en condiciones salinas, y las que reducen el anhídrido carbónico ( $\text{CO}_2$ ) a metano. Por lo tanto éstas viven en las profundidades del mar, en las aguas saladas y en las fuentes ácidas. Las eubacterias, en cambio, viven en el suelo, el agua y los organismos vivos. Entre ellas se encuentran las bacterias de interés médico, las bacterias verdes fotosintetizadoras, las cianobacterias o algas verde azules, y las bacterias púrpuras fotosintetizadoras. A continuación nos referiremos a las eubacterias simplemente como bacterias.

Como característica principal, los procariotas no poseen compartimientos intracelulares delimitados por membranas, por lo que carecen de membrana nuclear, a diferencia de los eucariotas. También es importante destacar que el DNA procariota es circular y cerrado, mientras que el eucariota se organiza en cromosomas individuales, y se asocia a proteínas de tipo histonas.

Las bacterias poseen una pared celular compuesta por peptidoglicano (a excepción de los *Mycoplasmas*), mientras que las células eucariotas no tienen este tipo de pared (la pared de las células vegetales es de celulosa).

La reproducción en los eucariotas puede producirse por mitosis o meiosis, mientras que los procariotas se reproducen por división simple. En este proceso, también llamado fisión binaria, la célula crece, se forma un tabique y finalmente se desprenden dos células nuevas. En este proceso se produce también, la replicación del DNA, de forma que las células hijas contienen cada una un duplicado idéntico del genoma de la progenitora.

El tamaño de la célula eucariota es mayor que el de la procariota. Los procariotas no poseen citoesqueleto, a diferencia de los eucariotas. Otra diferencia es la presencia de fimbrias o pili en las bacterias. Los procariotas pueden poseer flagelos, mientras que los de los eucariotas, si los poseen, tienen una estructura más compleja.

## TAMAÑO

El tamaño de las bacterias oscila entre 0.5 y 3  $\mu\text{m}$ , pudiendo llegar en algunos tipos a 10  $\mu\text{m}$ . Las bacterias de interés médico tienen un tamaño entre 0.4 y 2  $\mu\text{m}$ . Solo son visibles entonces, al microscopio óptico o microscopio electrónico. Para observarlas con el microscopio óptico, se usa el objetivo de inmersión (100X), sumergiendo esta lente en una gota de aceite de inmersión, en el preparado a observar. Su tamaño pequeño determina una relación entre la superficie y el volumen elevada, con alta tasa metabólica.

## MORFOLOGÍA

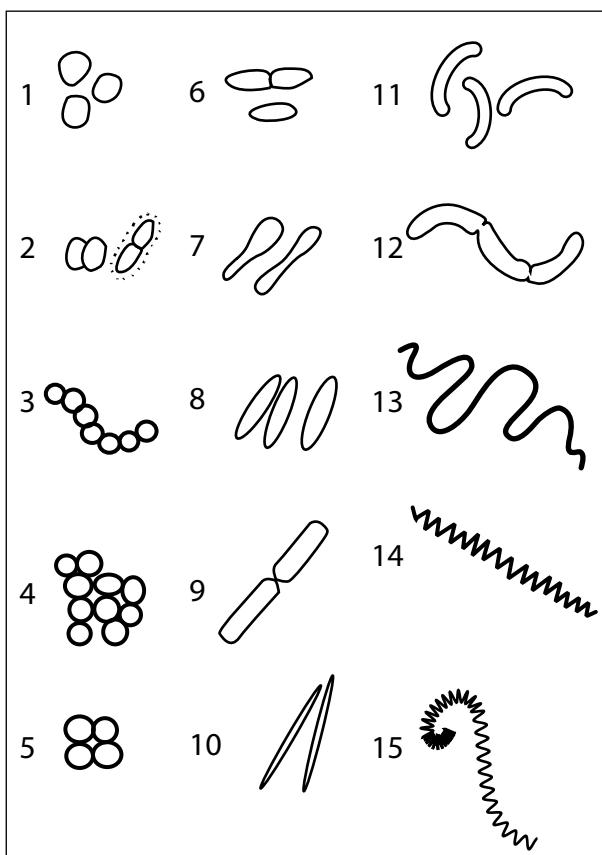
### Microscópica

La forma de las bacterias al microscopio está determinada por la rigidez de su pared celular. Básicamente, se diferencian según su forma en: cocos (esféricas u ovaladas), bacilos (cilíndrica o de bastones; rectos o curvos) y espirilos (espiral) (ver figura 2.1). Los espirilos varían en el número de vueltas, pudiendo tener pocas vueltas como en el género *Borrelia*, o muchas vueltas como en el género *Treponema*.

Las bacterias pueden mantenerse unidas unas con otras después de la división celular, pero conservando siempre la independencia celular. Si el plano de división es único, podemos encontrar diplococos o cocos en cadena (ejemplo microorganismos del género *Streptococcus*). Si los planos de división son muchos, los cocos pueden agruparse en tétradas o en racimos, como es el caso del género *Staphylococcus*.

Los bacilos pueden ser muy cortos (cocobacilos), o muy largos. Sus extremos pueden ser redondeados o rectos; pueden estar aislados, en cadenas, en filamentos o formando letras chinas como en el caso del género *Corynebacterium*. Los bacilos curvos pueden tener forma de coma, siendo un ejemplo *Vibrio cholerae*.

La morfología bacteriana debe ser observada con el microscopio óptico o el microscopio electrónico, dado el tamaño pequeño de estos microorganismos. El más usado en el laboratorio es el microscopio óptico de campo claro, pero existen otros como el



**Figura 2.1.**  
 1. cocos; 2. diplococo; 3. cocos en cadenas; 4. cocos en racimos; 5. cocos en tétradas; 6. cocobacilos; 7. bacilos; 8. bacilos bordes redondeados; 9. bacilos bordes rectos; 10. bacilos fusiformes; 11, 12. bacilos curvos; 13 al 15 espiroquetas.

microscopio óptico de campo oscuro en los que los organismos aparecen brillantes en fondo oscuro. Este microscopio permite la visualización de bacterias difíciles de colorear como *Treponema pallidum*, agente de la sifilis.

Las bacterias pueden observarse sin tinción (examen en fresco) si se las coloca en glicerol, o soluciones no acuosas que aumenten el índice de refracción; o con tinción usando distintas coloraciones que mejoran su visualización ya que son células incoloras. Dichas tinciones se basan en la afinidad que presentan los colorantes por las estructuras bacterianas. Los colorantes catiónicos por ejemplo, son atraídos por los componentes de carga negativa como los ácidos nucleicos y los polisacáridos. Ejemplo de este tipo son: el azul de metileno, el cristal violeta y la safranina.

El examen en fresco no es el más usado para observar la morfología bacteriana, porque las bacterias tienen citoplasma incoloro, y su índice de refracción no difiere mucho del vidrio y del agua. Con esta técnica se puede verificar la existencia de bacterias y evidenciar su capacidad para moverse. El examen en fresco también puede ser usado con técnicas especiales como la tinción con tinta china, que nos permite determinar la presencia de cápsula rodeando la bacteria. También puede usarse en el microscopio de campo oscuro por ejemplo para observar bacterias del género *Treponema* o *Leptospira*, con su movimiento característico.

Las coloraciones que se usan para teñir los preparados de bacterias, se pueden dividir en simples, diferenciales y especiales. Las primeras, por ejemplo el azul de metileno, permiten observar la existencia de bacterias, su morfología, agrupación, la presencia de esporos, y la existencia de otros tipos celulares. Las diferenciales como por ejemplo la coloración de Gram y la de Ziehl Nielsen, además de lo anterior, permiten la diferenciación de las bacterias porque usan diferentes colorantes, que se comportan distinto según el microorganismo en cuestión. Las tinciones especiales se usan para objetivar distintas estructuras como la cápsula, el núcleo, los flagelos, esporos, etc.

Antes de la coloración hay que realizar la preparación y la fijación del frotis. Con la fijación del frotis se pretende obtener la muerte de los microorganismos, la adhesión a la lámina, y la conservación de su morfología. Después de preparar y fijar el frotis, se puede realizar cualquier tipo de coloración.

La coloración de Gram es la más usada en bacteriología, y debe su nombre a quién la describió en 1884. Es una coloración diferencial, dado que las bacterias pueden clasificarse según su respuesta en Gram positivas, o Gram negativas. Las primeras se tiñen de color azul violeta, y las segundas adquieren un color rosado o rojo. La diferente reacción de las bacterias a la coloración de Gram, se relaciona con diferencias fundamentales de la envoltura celular de estas dos clases de células.

En el cuadro 2.1 se muestran los colorantes usados, su tiempo de aplicación, y la diferente coloración que adoptan las bacterias Gram positivas y Gram negativas, en cada paso de la coloración de Gram.

### **Macroscópica**

La mayoría de las bacterias se multiplican rápidamente, y son visibles como colonias cuando se las siembra en medios de cultivo sólidos adecuados. Requieren una incubación de aproximadamente 24 horas en una atmósfera que favorezca su desarrollo, a temperatura óptima. Existen excepciones como *Mycobacterium tuberculosis*, que requiere para su desarrollo de dos a ocho semanas de incubación.

Una colonia está constituida por los descendientes de una o unas pocas células. Las características de la colonia también dependen de la movilidad de la bacteria.

**Cuadro 2.1.** Tinción de Gram

Solución	Tiempo de aplicación	Bacterias grampositivas	Bacterias gramnegativas
Colorante: cristal violeta	30 s	Violeta	Violeta
Mordiente: lugol	1min	Violeta	Violeta
Decolorante: alcohol acetona	10-15 min	Violeta	Incolora
Colorante de contraste: safranina	1min	Violeta	Rosada

El tamaño puede variar desde 0.5 mm como *Haemophilus* spp. o *Neisseria gonorrhoeae*, a más grandes como las enterobacterias.

La forma de la colonia puede ser circular (ejemplo *Staphylococcus*), irregular, o filamentosa (ejemplo *Bacillus*). Los bordes pueden ser ondulados característicos de los bacilos largos como *Bacillus anthracis*, en sierra o dentados como en *Yersinia pestis*, o lisos como *Proteus vulgaris* o *Escherichia coli*.

La superficie de la colonia también es orientadora y puede ser: plana, convexa, mamelonada, o umbilicada (ejemplo *Streptococcus pneumoniae*).

En relación al pigmento que adquieren, éste puede ser: verde (*Pseudomonas aeruginosa*), amarillo (*Staphylococcus aureus*), etc. También es diferente el comportamiento frente a la luz: brillante u opaca. Pueden presentar olores particulares como el frutal de *Pseudomonas aeruginosa*, o el putrefacto de los anaerobios.

Por último hay que destacar, que la consistencia de la colonia varía en los diferentes grupos de bacterias, pudiendo ser mucoide (M), liso (S) o rugoso (R). Las colonias M tienen aspecto acuoso, brillante, propio de las bacterias capsuladas, o que forman cubiertas polisacáridas como *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*. Los polímeros capsulares pueden ser específicos de grupo, y son generalmente antigenicos. Entre las bacterias patógenas, las formas capsuladas suelen ser más virulentas. Por otra parte, las colonias S son de aspecto homogéneo, de textura uniforme, y son características de microorganismos de tipo salvaje recientemente aislados de su hábitat natural. Las colonias R son de aspecto granulado, en general son cepas mutantes que carecen de proteínas o polisacáridos de superficie. Las formas R de enterobacterias, por ejemplo, generalmente no son virulentas, en oposición a la mayor resistencia de las bacterias procedentes de colonias S de tipo salvaje. Un cuarto tipo de colonia es la L, y se asocia a la ausencia de la pared celular como resultado de la exposición a antibióticos; en general estas formas vuelven a sintetizar la pared celular una vez que el fármaco se extrae del medio.

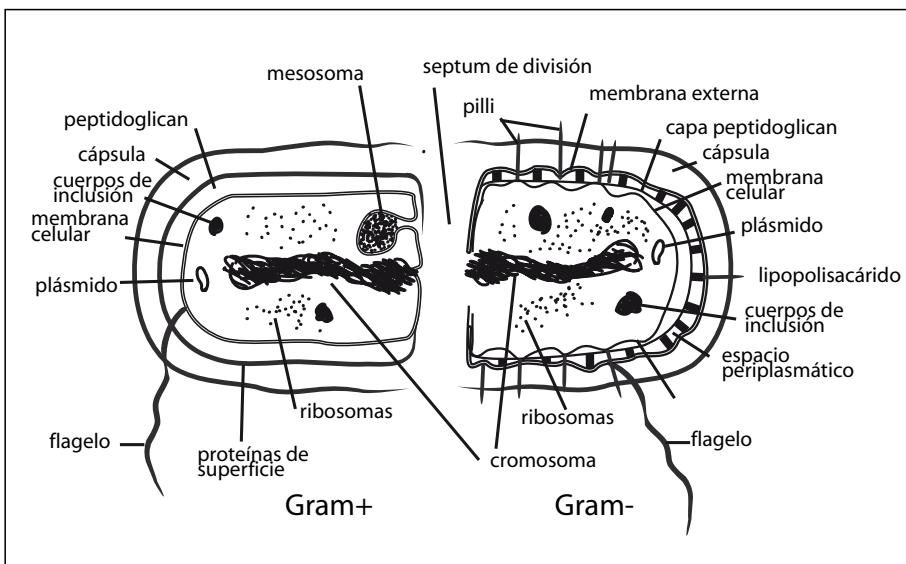
## ESTRUCTURA BACTERIANA

Las diferentes estructuras bacterianas, mostradas en la figura 2.2, se pueden dividir según sean constantes en las células o no, en estructuras permanentes o variables. Dentro de las primeras se destaca la pared celular, la membrana celular, los ribosomas y el genoma bacteriano. Las estructuras variables son flagelos, fimbrias o pili, cápsula, esporos, plásmidos y cuerpos de inclusión.

Las estructuras variables son aquellos que existen en algunas bacterias pero no en todas. Un mismo grupo bacteriano o una misma cepa bacteriana las puede presentar

**Figura 2.2.**

**Diagrama de la pared bacteriana.** Grampositiva a la derecha y gramnegativo a la derecha



o no, dependiendo de las condiciones en donde se desarrolle. Estas estructuras, no resultan esenciales para la vida de la bacteria.

Además podemos clasificar las estructuras bacterianas en internas o citoplásmicas, y externas o de la envoltura celular. Dentro de las internas destacamos el material genético, los ribosomas y los cuerpos de inclusión. La envoltura celular engloba la membrana plasmática, la pared celular que la recubre, la cápsula, y los apéndices como fimbrias, o pili y flagelos. Contiene los sitios de transporte para nutrientes, interviene en la relación huésped parásito, es blanco de las reacciones del sistema inmune, y puede contener estructuras tóxicas para el huésped.

### Estructuras internas o citoplasmáticas

Las estructuras internas están inmersas en el citoplasma, solución acuosa y viscosa que contiene solutos orgánicos e inorgánicos, y elementos especializados como los ribosomas y los cuerpos de inclusión.

#### MATERIAL GENÉTICO

##### DNA cromosómico

El DNA tanto procariota como eucariota, se compone de dos cadenas helicoidales de nucleótidos de purina y de pirimidina, unidos entre sí por enlaces de hidrógeno, formando una doble hélice según el modelo de Watson y Crick.

Las bacterias no poseen membrana nuclear, nucléolo ni aparato mitótico, y nunca configuran una masa cromosómica definida, a diferencia de las células eucariotas. Aunque no existe un núcleo delimitado, hay una zona nuclear o nucleoide.

Su material genético está constituido por una molécula de DNA circular, enrolado sobre sí mismo, y asociado a proteínas básicas que no constituyen verdaderas histonas.

### Plásmidos

Constituyen el material genético extracromosómico. Están constituidos por secuencias cortas de DNA circular bícatenario, que pueden existir y replicarse independientemente del DNA cromosómico, y son heredados por las células hijas. Aunque no son esenciales para la vida de la bacteria, generalmente proveen a ésta una ventaja selectiva, por ejemplo la resistencia a los antibióticos, nuevas capacidades metabólicas o patogénicas (cuando codifican para factores de virulencia como toxinas, etc.), u otras numerosas propiedades. Pueden transferirse de bacteria a bacteria mediante un proceso denominado conjugación (ver capítulo de genética bacteriana).

### RIBOSOMAS

Los ribosomas se encuentran libres en el citoplasma, y están compuestos por proteínas y ácido ribonucleico (RNA).

Su coeficiente de sedimentación es de 70S, a diferencia de la célula eucariota que es de 80S, con dos subunidades de 50S y de 30S.

Pueden presentarse aislados o como polirribosomas, asociados a RNA mensajero (RNAm), y a DNA cromosómico. Un mismo RNAm puede ser traducido por varios ribosomas simultáneamente durante la síntesis proteica. Los RNAm bacterianos difieren en el número de proteínas para las que codifican, ya que algunos representan un único gen (monocistrónicos), y otros como la mayoría, tienen secuencias que codifican para más de una proteína (policistrónicos).

Su función es la síntesis proteica, y su cantidad aumenta cuando la bacteria crece en medios ricos. Su alto contenido de sustancias ácidas los hace sensibles a la tinción con colorantes positivos, o básicos como el cristal violeta y el azul de metileno.

### CUERPOS DE INCLUSIÓN

Los cuerpos de inclusión son gránulos de material orgánico o inorgánico, algunas veces rodeados de membrana. En general funcionan como almacenamiento de compuestos energéticos, que son usados como fuente de energía (polisacáridos, lípidos, polifosfatos). El glucógeno constituye el principal elemento almacenado por las enterobacterias (40% de su peso). Algunas pseudomonas acumulan carbono como ácido poli- $\alpha$ -hidroxibutirato, y las micobacterias contienen gránulos de polifosfato. Con frecuencia las inclusiones pueden verse directamente con el microscopio de luz sin tinciones especiales.

## Estructuras externas o de la envoltura celular

### MEMBRANA CELULAR

La membrana celular es una estructura vital para la bacteria. Representa una barrera que separa el interior, del exterior celular.

Consiste en una bicapa lípida similar a otras membranas biológicas, compuesta por fosfolípidos anfipáticos; no posee esteroles a diferencia de las eucariotas, con la excepción de los mycoplasmas. La membrana se halla estabilizada por puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, y cationes como el calcio y el magnesio que se combinan con los fosfolípidos cargados negativamente. Insertas en ella se encuentran múltiples proteínas transmembrana, que facilitan el transporte de sustancias hidrofílicas a través de ésta. Como las bacterias no poseen membranas internas, todos los sistemas de fosforilación, oxidación, y transporte de electrones (citocromos) para la producción de energía, se encuentran a nivel de la membrana celular.

La membrana celular cumple la función de barrera osmótica, tiene permeabilidad selectiva, y permite el ingreso de nutrientes y la salida de desechos, por mecanismos de transporte activo y pasivo. En ella se encuentran los sistemas de fosforilación oxidación, y el transporte de electrones para la producción de energía; además tiene las enzimas necesarias para la síntesis de lípidos de la pared celular, como por ejemplo el bactoprenol, y lípidos de la cápsula entre otros. Finalmente la membrana contiene moléculas receptoras especiales, que ayudan a las bacterias a detectar y responder a sustancias químicas del medio externo.

#### PARED CELULAR

La pared celular está ubicada por fuera de la membrana plasmática, y es una estructura vital para las bacterias que la poseen. Los fármacos que bloquean su formación ocasionan la lisis y muerte de las bacterias. Excepto los *Mycoplasmas*, todas las bacterias tienen una pared celular que les da forma, y las protege de la lisis osmótica. La pared celular de muchos microorganismos patógenos tiene componentes que contribuyen a su patogenicidad.

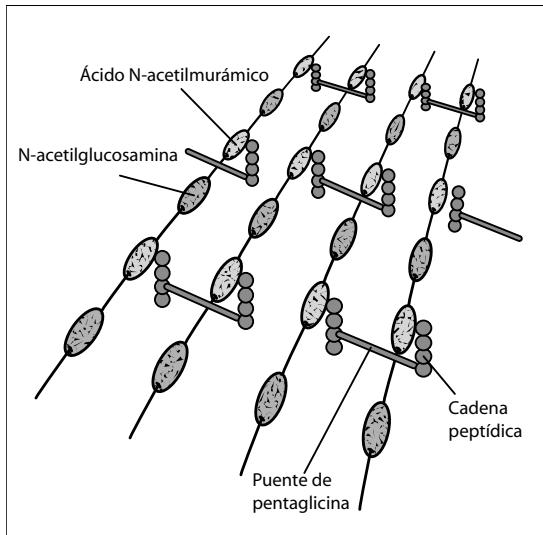
Después de que Christian Gram en 1884 desarrollase la tinción que lleva su nombre, se comprobó que las bacterias podían clasificarse en dos grupos principales, según su respuesta a esta coloración. Las bacterias Gram positivas se tiñen de color azul violeta, y las Gram negativas adquieren un color rosa o rojo. La diferencia estructural verdadera entre ambos grupos, se puso de manifiesto con el desarrollo del microscopio electrónico. La pared de una célula Gram positiva está formada por una única capa, homogénea de 20 a 80 nm de grosor de peptidoglicano o mureína, situada por fuera de la membrana celular. Por el contrario, la pared de la célula Gram negativa es más compleja, ya que posee una capa de 2 a 7 nm de grosor de peptidoglicano, rodeada por una membrana externa. Las bacterias ácido-alcohol resistentes también tienen una capa fina de peptidoglicano.

En las microfotografías electrónicas, se observa un espacio entre la membrana plasmática y la membrana externa de las bacterias Gram negativas, y a menudo entre la membrana plasmática y la pared celular en las Gram positivas. Dicho espacio se denomina espacio periplásmico y está ocupado por un gel, el periplasma. El espacio periplásmico de las bacterias Gram negativas contiene muchas proteínas que participan en la captación de nutrientes, por ejemplo enzimas hidrolíticas (proteasas, lipasas, fosfatasas,  $\beta$ -lactamasas), que convierten las macromoléculas en productos más pequeños. A su vez, estos nutrientes pueden ser metabolizados por la bacteria, enzimas que participan en la síntesis del peptidoglicano, y en la modificación de compuestos tóxicos que podrían lesionar la célula, factores de virulencia como colagenasas, hialuronidasas y proteasas.

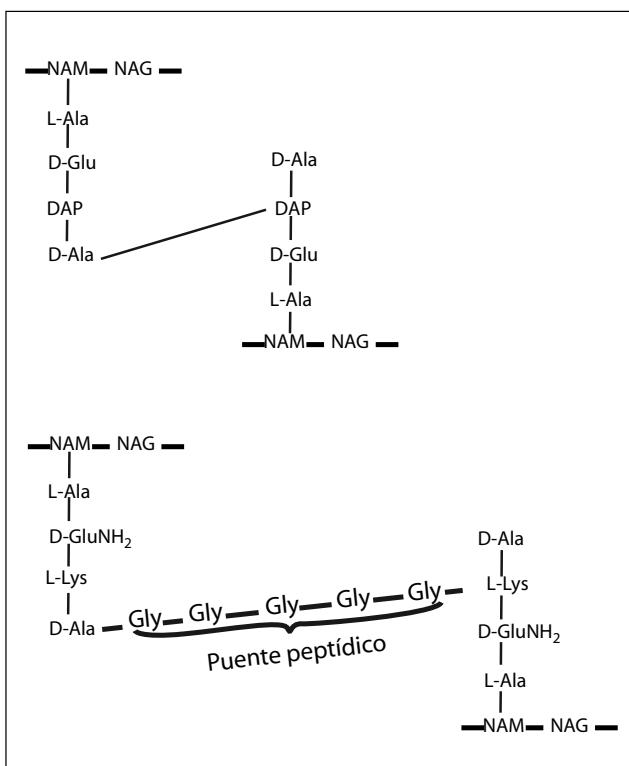
#### Estructura del peptidoglicano o mureína

Se pueden reconocer dos regiones (figura 2.3) que son:

- un polímero de aminoazúcares orientado en sentido transversal, compuesto por la unión cíclica y repetitiva de un dímero de N-acetilglucosamina (NacGlc), y ácido N-acetilmurámico (NacMur) mediado por uniones  $\beta$ 1-4;
- una fracción peptídica formada por un pentapéptido, unido covalentemente a la molécula de NacMur, y en general constituida por L-alanina (L-ala), D-glutámico (D-glu), ácido mesodiaminopimélico (mDAP) en bacilos Gram negativos, o L-lisina (L-Lys) en Gram positivos, y un dipéptido terminal D-alanil-D-alanina (D-ala-D-

**Figura 2.3.**

**Estructura del peptidoglicano.** Diagrama esquemático de un segmento de peptidoglicano que muestra las cadenas laterales de polisacáridos, cadenas peptídicas y puentes peptídicos

**Figura 2.4.**

**Entrecruzamientos en el peptidoglucano.**

Arriba: peptidoglucano de *E. coli* con enlace directo, típico de muchas bacterias gramnegativas. Abajo: peptidoglucano de *S. aureus*. NAM: N-acetilmurámico; NAG: N-acetilglucosamina; Gly: glicina

ala). La estructura compuesta por NacGlc-NacMur-pentapéptido constituye el precursor del peptidoglicano.

Entre las unidades peptídicas se produce el entrecruzamiento longitudinal que le otorga funcionalidad al polímero. Este entrecruzamiento en bacilos Gram negativos se realiza mayoritariamente entre D-ala ubicada en la posición cuatro y mDAP; mien-

tras que los Gram positivos como por ejemplo en el *Staphylococcus aureus*, utilizan un pentapéptido de glicina para unir D-ala a L-Lys (figura 2.4). Este entrecruzamiento tridimensional le otorga rigidez a la molécula de peptidoglicano, lo que le permite cumplir con sus funciones principales de mantenimiento de la presión osmótica, determinación de la forma bacteriana, y participación en la elongación y división celular.

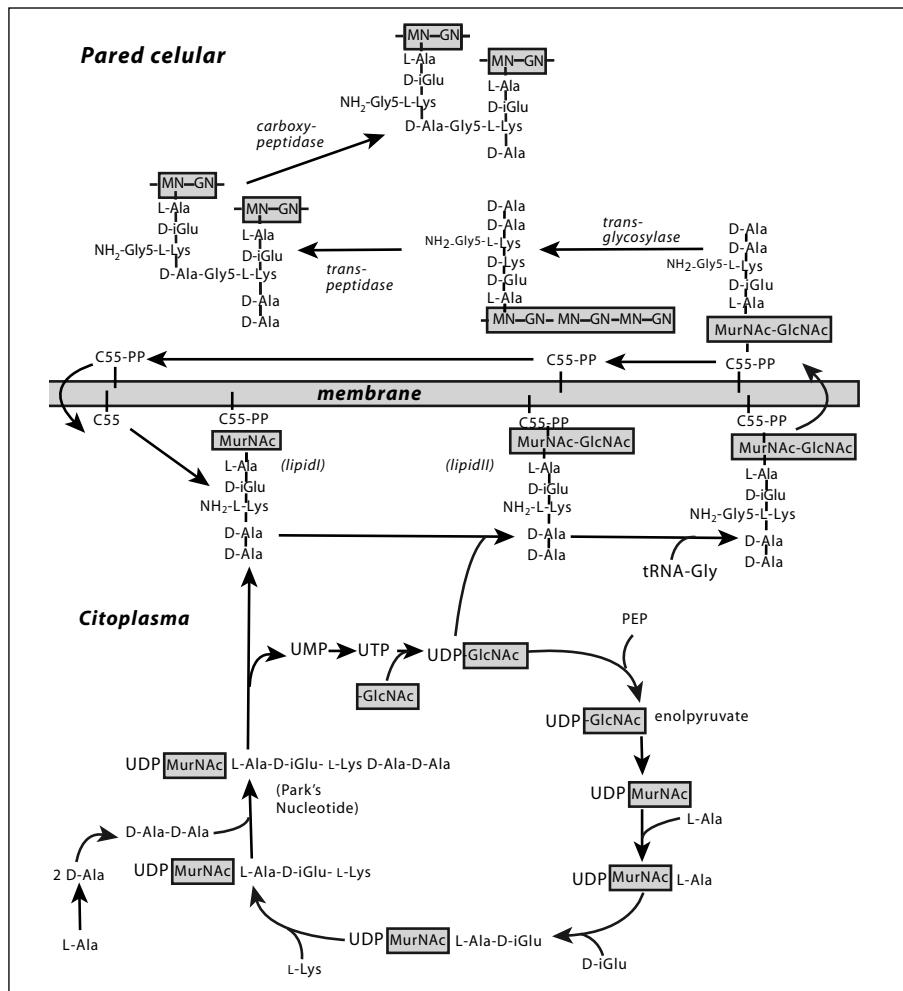
### Biosíntesis del peptidoglicano

Se puede dividir en tres grandes pasos (figura 2.5):

1. intracitoplasmático, dependiente de ATP donde se forma el precursor NacGlc-NacMur-pentapéptido unido a UDP (uridin-difosfato);
2. la segunda etapa es intramembrana y consiste en la unión mediante un enlace de

**Figura 2.5.**

**Diagrama de la biosíntesis del peptidoglicano.** PEP, fosfoenolpiruvato; MurNAc y MN, ácido N-acetilmurámico; GlcNAc y GN, N-acetilglucosamina; C55, bactoprenol.



- pirofosfato del precursor, a un lípido transportador (bactoprenol), y la transposición hacia el espacio periplásmico;
3. la tercer y última etapa es periplásmica; y consiste básicamente en dos pasos: la elongación del peptidoglicano preexistente, y el entrecruzamiento de las cadenas peptídicas.

#### ETAPA CITOPLASMÁTICA

Una vez sintetizado el UDP-Nac-Mur como producto derivado de la reducción del UDP-Nac-Glc, comienza la fase de ensamblaje del componente peptídico. Esto se produce mediante uniones secuenciales y consecutivas, mediadas por ligasas que van agregando de forma secuencial L-alanina, D-glutámico, y ácido mesodiaminopimélico o L-lisina, según se trate de bacterias Gram negativas o Gram positivas. El último dipéptido (D-alanil-D-alanina) se introduce ya preformado. Si bien esto parece un detalle insignificante, es éste dipéptido el que interactúa con las transpeptidasas, o proteínas de unión a penicilina (PBP), permitiendo el entrecruzamiento del peptidoglicano. Esta es la estructura que simulan los  $\beta$ -lactámicos para ejercer su efecto, y es el sitio blanco de acción de los glicopéptidos como vancomicina.

El ingreso de alanina a la célula bacteriana, se produce a través de porinas específicas para dicho aminoácido, que permiten el ingreso tanto de las formas D como L-alanina. Una vez en el interior de la célula, una racemasa convierte parte de las formas L en D, y finalmente una ligasa específica produce los dipéptidos D-ala-D-ala, que completan el pentapeptido. Este compuesto UDP-Nac-Mur-pentapeptido que es hidrosoluble, se une a la cara interna de la membrana citoplasmática, y mediante una unión dependiente de energía mediada por una translocasa I, se relaciona al lípido transportador denominado bactoprenol, dando comienzo a la etapa transmembrana.

#### ETAPA TRANSMEMBRANA

De esta manera se genera el lípido I (bactoprenol unido a través de un enlace de pirofosfato al Nac-Mur-pentapeptido). Con esta unión se consigue enmascarar la hidrosolubilidad del peptidoglicano, de manera que pueda atravesar la bicapa lipídica. La translocasa II es responsable del agregado del Nac-Glc, constituyéndose así el Lípido II. La transposición del lípido II ocurre entonces de un modo aún no dilucidado, promoviendo la colocación del precursor del peptidoglicano, ahora asomando hacia el espacio periplásmico.

#### ETAPA PERIPLÁSMICA

Fundamentalmente se produce en tres etapas: la transglucosilación, la separación del lípido transportador, y el entrecruzamiento peptídico (transpeptidación). La primera y la última la realizan enzimas con actividad transglucosilasa y transpeptidasas, más conocidas como PBP por *Penicillin binding protein*, que se encuentran ubicadas en la membrana citoplasmática con su sitio activo hacia el espacio periplásmico.

Las principales PBP denominadas en general PBP I, II y III (debido a que son las de mayor peso molecular), tienen en sus extremos carboxi y amino terminal las funciones transpeptidasas y transglucosilasas. Sin embargo solo la función de transpeptidasa es inhibible por  $\beta$ -lactámicos. La separación del lípido II se produce por acción de una pirofosfatasa, que rompe el enlace pirofosfato dejando al bactoprenol libre para comenzar otra vez el ciclo.

Las transpeptidasas reconocen la estructura estereoquímica del dipéptido D-alá-D-ala, y mediante clivaje de la última alanina, liberan la energía necesaria para realizar el entrecruzamiento con el mDAP en Gram negativos, o el puente peptídico intermedio de los Gram positivos. La regulación de este mecanismo de síntesis es de modo tal, que la inhibición de la transpeptidación inhibe todo el mecanismo de síntesis de pared.

Las transglicosilasas son enzimas producidas por las bacterias que forman “brechas” en la “vieja” pared celular, donde se agrega el peptidoglicano de la nueva pared en formación.

#### **Estructura de la pared celular de las bacterias Gram positivas**

La gruesa pared celular de las bacterias Gram positivas, está constituida principalmente por peptidoglicano. Se cree que esta gruesa capa de peptidoglicano, es la determinante de que estas bacterias retengan el cristal violeta de la coloración de Gram.

Sin embargo, estas células contienen también una gran cantidad de ácido teicoico, que son polisacáridos que se unen al ácido N-acetilmurámico, o a los lípidos de la membrana plasmática (en este último caso se denomina ácido lipoteicoico). Tanto los ácidos teicoicos como los lipoteicoicos, tienen la función de estabilizar la pared celular. Además los ácidos teicoicos tienen un rol en la virulencia de estos microorganismos, porque actúan como antígenos de superficie que se unen a receptores específicos en las células del huésped.

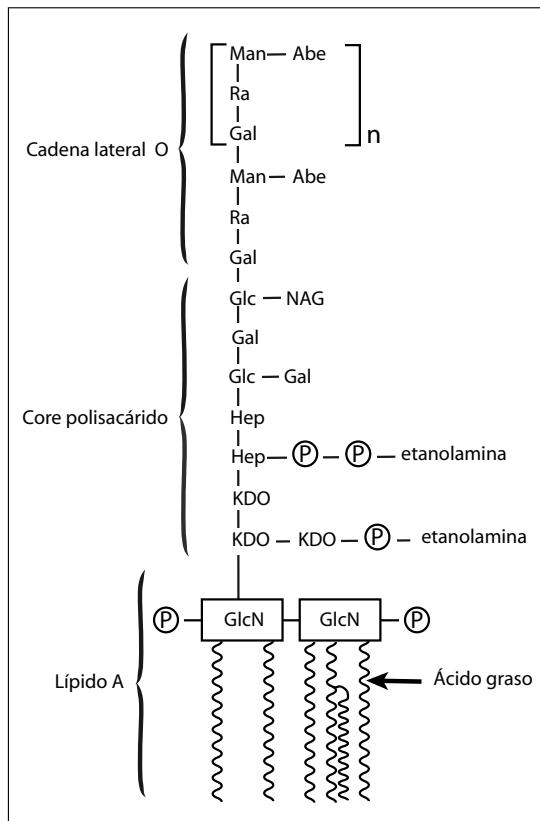
La superficie externa del peptidoglicano de las bacterias Gram positivas, está generalmente cubierta de proteínas. Los diferentes grupos de bacterias Gram positivas y las diferentes especies, difieren en la composición de sus proteínas y ácidos teicoicos, siendo esto es útil para la clasificación serológica y la identificación bacteriana.

#### **Estructura de la pared celular de las bacterias Gram negativas**

Si observamos la pared de las bacterias Gram negativas al microscopio electrónico, podemos observar tres zonas: la membrana plasmática, el espacio periplásmico que incluye una fina capa de peptidoglicano, y la membrana externa. Esta última, exclusiva de las bacterias Gram negativas, es una bicapa lipídica que difiere de otras membranas por su capa externa, que está constituida por una molécula anfipática: el lipopolisacárido (LPS) o endotoxina. Además del LPS, la membrana externa contiene fosfolípidos y proteínas que la unen al peptidoglicano.

El LPS está constituido por tres partes: el lípido A, el polisacárido central o core, y la cadena lateral O (ver figura 2.6). La región del lípido A está inmersa en la membrana externa, y el resto de la molécula del LPS sobresale de la superficie celular. El core o polisacárido central está unido al lípido A. La cadena O u antígeno O, consiste en unidades repetidas de una subunidad tetrasacárida, y es muy variable en su composición entre las diferentes familias, especies, y aún dentro de la misma especie de bacterias Gram negativas. En cambio, el polisacárido del core es constante para un mismo género bacteriano. El polisacárido O por su variabilidad, es usado frecuentemente para la clasificación serológica de las bacterias.

La mayoría de las bacterias sintetizan moléculas de LPS con un antígeno O de longitud completa, algunas especies fabrican moléculas cortas de antígeno O, y otras casi no lo sintetizan. Las formas con poco o ningún antígeno O se conocen como rugosas, en oposición a las formas lisas productoras de antígeno O de tamaño completo.

**Figura 2.6.**

**Estructura del LPS de *Salmonella*.** Abe, abecuosa; Gal, galactosa; Glc, glucosa; GlcN, glucosamina; Hep, heptulosa; KDO, 2-ceto-3-desoxioctonato; Man, manosa; NAG, N-acetilglucosamina; P, fosfato; Ra, L-ramnosa.

Macroscópicamente se observan como colonias de bordes rugosos (LPS truncado), o colonias lisas (LPS completo).

Una de las funciones más importantes de la membrana externa es servir como barrera protectora, de forma que evita o disminuye la entrada de sales biliares, antibióticos y otras sustancias tóxicas que podrían destruir o lesionar la bacteria. La membrana externa es más permeable que la plasmática, y permite el pasaje de pequeñas moléculas como glucosa y otros monosacáridos. Dicho pasaje se debe a la presencia de porinas, proteínas integrales o transmembrana, que forman canales estrechos por los cuales pasan moléculas menores de 600 a 700 D. Moléculas de mayor tamaño como la vitamina B12, pueden atravesar la membrana externa por transportadores específicos. Esta membrana externa previene la pérdida de constituyentes como las enzimas periplásmicas.

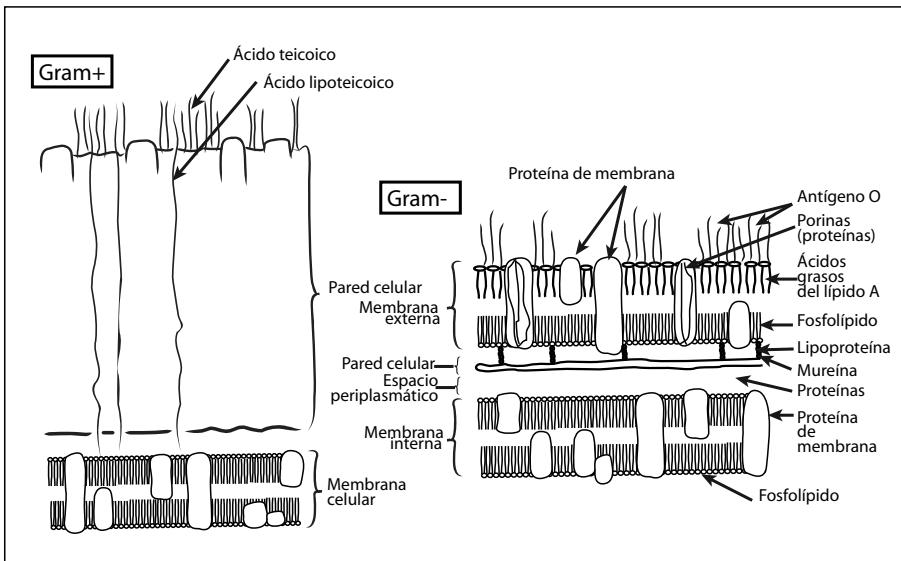
En la figura 2.7 se esquematiza la estructura de la envoltura de una bacteria Gram positiva, y de una Gram negativa.

#### Fundamento de la coloración de Gram

Es probable que la diferencia entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas se deba a la naturaleza física de sus paredes celulares. El peptidoglicano no se tiñe por sí mismo, más bien parece actuar como barrera de permeabilidad para evitar la pérdida de cristal violeta. Durante el proceso de coloración, las bacterias se tiñen primero con

**Figura 2.7.**

**La estructura de envoltura de un microorganismo grampositivo (izquierda) y un microorganismo gramnegativo (derecha).** No se muestran las cápsulas y los apéndices ni las proteínas de superficie, como la proteína M de los etreptococos. Obsérvese la cantidad 20 veces mayor peptidoglicano en el microorganismo grampositivo. La membrana externa de la envoltura del microorganismo gramnegativo muestra moléculas de polisacáridos del antígeno O cubriendo la capa externa



crystal violeta, y luego se tratan con yoduro para favorecer la retención del colorante. En la decoloración con etanol, se cree que el alcohol contrae los poros de la capa gruesa de peptidoglicano, y se retiene el complejo colorante yoduro, así las bacterias adquieren color violeta. Por el contrario, la capa de peptidoglicano de las bacterias Gram negativas es muy fina, con menos enlaces y con poros de mayor tamaño. Además, es posible que el tratamiento con alcohol, extraiga suficientes lípidos de la membrana externa como para aumentar su porosidad. Por estos motivos el alcohol elimina más fácilmente el complejo cristal violeta yoduro en las bacterias Gram negativas.

#### Funciones de la pared celular

La pared celular otorga rigidez, y da forma a las bacterias, protegiéndolas de la lisis osmótica. Su importancia clínica deriva de su susceptibilidad a la acción de los antibióticos, dado que éstos actúan sobre un blanco que no es propio del hombre, y que es vital para la vida bacteriana (poseen toxicidad selectiva). También actúa como filtro, impidiendo el ingreso de algunas moléculas y permitiendo la entrada de metabolitos imprescindibles y agua. Contiene determinantes patogénicos, como el lípido A del LPS, y estructuras antigenicas que sirven para identificar y clasificar a la bacteria (antígeno O de las enterobacterias o polisacárido C del *Streptococcus* spp.).

También han sido ensayados como inmunógenos en la producción de vacunas, antígenos de la pared celular (antígeno O del LPS y proteínas de la membrana externa); por ejemplo en la vacuna antimeningocócica para el grupo B. La porción central del LPS o core, que es invariable entre las diferentes bacterias y no es tóxica, también se ha ensayado como inmunógeno.

### Principales efectos del lipopolisacárido o endotoxina

El LPS es termoestable, resistente incluso a la esterilización con autoclave. Su actividad endotóxica se asocia al componente lipídico A, liberado cuando la célula se lisa como consecuencia de la fagocitosis o de la acción antibióticos (de ahí el nombre de endotoxina). Hoy se sabe que la gravedad del cuadro clínico depende de la cantidad de endotoxina circulante, pudiendo determinar desde un simple cuadro infeccioso con fiebre, hasta sepsis, falla multiorgánica y muerte.

Pequeñas cantidades de endotoxina provocan reacciones de alarma, como fiebre, activación del complemento por la vía alternativa, activación de los macrófagos, y estimulación de linfocitos B. En grandes dosis produce shock e incluso la muerte.

Cuatro tipos de células constituyen el blanco primario de la endotoxina. Uno de ellos son los fagocitos mononucleares como los macrófagos del bazo, de la médula ósea, de los alvéolos pulmonares y de la cavidad peritoneal, monocitos de la sangre periférica y células de Kupffer. Otras células blanco son los neutrófilos, las plaquetas, y los linfocitos B. Es probable que estas células tengan receptores de endotoxina específicos.

La endotoxina también actúa como pirógeno, por lo tanto causa fiebre cuando se acumula suficiente cantidad de bacterias Gram negativas en los tejidos, como para hacer contacto con la circulación. La fiebre se produce porque la endotoxina, induce la liberación de ciertas proteínas conocidas como pirógenos endógenos desde los fagocitos mononucleares. Los pirógenos mejor conocidos son la interleuquina-1 (IL-1), y el factor de necrosis tumoral (TNF). Las bacterias Gram positivas también inducen fiebre, pero como carecen de endotoxina, son los componentes de la pared celular los que causan liberación de la IL-1 y del TNF.

La endotoxina activa el complemento por la vía alternativa. Esto trae como consecuencia la producción del complejo de ataque a la membrana, la quimiotaxis de los fagocitos (C5a fundamentalmente), y la opsonización (C3b). La activación del complemento conduce también a un aumento de la permeabilidad vascular mediado por las anafilotoxinas C3a y C5a, y a la liberación de enzimas lisosómicas desde los neutrófilos (degranulación). Todos estos efectos producen la respuesta inflamatoria.

La endotoxina activa los macrófagos, es decir los estimula para que aumenten la producción de enzimas lisosómicas, aceleren la velocidad de la fagocitosis, y secretan algunas hidrolasas hacia el medio. La acción de los macrófagos activados incluye la destrucción de ciertas células cancerosas, por lo que el estudio de los derivados de endotoxina como potenciales agentes antitumorales, es un tema de muchas investigaciones.

Cuando se libera la IL-1, la endotoxina induce la división de los linfocitos B. Estos maduran a células productoras de anticuerpos, y aumentan la resistencia a las infecciones por aumento del nivel de anticuerpos.

Cuando se administran grandes cantidades de endotoxina, se produce un shock endotóxico, con frecuencia letal, que se manifiesta por caída severa de la presión arterial, y un fenómeno denominado coagulación intravascular diseminada (CID), entre otros. El CID es el resultado del depósito de trombos en los vasos de pequeño calibre, con el consiguiente daño en las áreas privadas de irrigación sanguínea. El consumo de plaquetas, así como de factores de la coagulación (II, V y VII) excede la velocidad de producción, lo que conduce a hemorragias internas y falla orgánica (fundamentalmente en pulmón, riñón e hígado). La endotoxina contribuye a la coagulación de la sangre de tres formas: activa el factor de Hageman o factor XII de la coagulación,

quien activa la vía intrínseca de la coagulación; provoca la liberación de gránulos de las plaquetas que están involucrados en la coagulación, y provoca la liberación de proteínas básicas de los neutrófilos que estabilizan los coágulos de fibrina.

Hoy se cree que los mediadores claves de la hipotensión inducida por la endotoxina, son el TNF y la IL-1. Un punto de vista previo sostiene que la caída de la resistencia de los vasos periféricos, se debe a la acumulación de aminas vasoactivas (histamina y quinina).

Las bacterias Gram positivas no poseen endotoxina, pero pueden producir un cuadro similar al del shock endotóxico de las bacterias Gram negativas. Las mismas citoquinas que se liberan ante la presencia del LPS, son liberadas ante la presencia de la pared de las bacterias Gram positivas, produciendo los mismos efectos. A la luz de las investigaciones actuales, los fragmentos de peptidoglicano y de ácidos teicoicos, juegan un papel semejante al del LPS. Si se inyectan a animales tienen efectos similares a los producidos por la endotoxina de los microorganismos Gram negativos.

### **Estructura de la pared celular de las bacterias ácido-alcohol resistentes**

Nos referiremos como modelo de este grupo al género *Mycobacterium*. Además del peptidoglicano, la pared celular de las micobacterias tiene muchos glucolípidos como el complejo lipídico arabinogalactano, y los ácidos micólicos, éstos últimos solo son encontrados en las *Mycobacterium* y las *Corynebacterium sp*. Esta gran cantidad de lípidos hace que las bacterias ácido alcohol resistentes no se tiñan, o lo hagan mal con la coloración de Gram. Para teñirla, se recurre a coloraciones con fucsina (colorante rojo), con calentamiento del colorante. Luego de este procedimiento, resisten la decoloración de una mezcla de alcohol y ácido, que constituye la tinción de Ziehl Nielsen. Esta gran cantidad de lípidos de la pared, 10% del total del peso de la micobacteria, la protege de la acción deletérea de los componentes del fagolisosoma, y probablemente sea la razón por la que las micobacterias pueden sobrevivir dentro de los macrófagos. Los componentes de la pared de las micobacterias tienen gran capacidad de estimular al sistema inmune y es debido a esto que se utilizan como adyuvantes en modelos experimentales de inmunización de animales (adyuvante de Freund), con el objetivo de aumentar la producción de anticuerpos específicos contra antígenos proteicos inoculados.

De todo lo expuesto, se desprende la importancia del conocimiento de las diferentes paredes celulares de las bacterias (Gram positivas, Gram negativas, y ácido alcohol resistentes) a la hora de estudiar mecanismos de agresión, sensibilidad a los antibióticos, taxonomía, clasificación bacteriana, identificación, etc.

### **CÁPSULA**

La cápsula cuando existe, está ubicada por fuera de la pared celular. Las bacterias producen material capsular que, cuando se asocia íntimamente a la superficie celular, recibe el nombre de cápsula. Si su adherencia es débil y de grosor variable, se conoce como limo.

Generalmente es de naturaleza polisacárida, a excepción de la cápsula del *Bacillus anthracis* que es peptídica.

No es una estructura vital para la célula, su pérdida no se relaciona con la pérdida de viabilidad celular, pero sí con cambios de la morfología colonial, y con la pérdida de la virulencia bacteriana.

La virulencia de algunos patógenos se correlaciona con la presencia de cápsula,

como por ejemplo *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* tipo b. La cápsula protege a la bacteria de la fagocitosis, principal mecanismo de defensa que pone en juego el huésped, ante la presencia bacteriana. Una respuesta efectiva para defenderse de este tipo de bacterias, implica la producción de anticuerpos que se unan específicamente a la cápsula, facilitando la opsonización y la fagocitosis.

De su capacidad antigénica se desprende el uso de la cápsula para la producción de diferentes vacunas, que estimulan la formación de anticuerpos específicos. Ejemplos de ellas son las vacunas: anti neumocócica, anti *H. influenzae* tipo b, y anti meningocócica A, B y C.

Las bacterias que producen cápsula forman en los medios sólidos colonias acuosas, mucoide (M) o lisas (S); en cambio las cepas rugosas (R), no producen cápsula. La pérdida de la capacidad de formar cápsula por mutación S a R, se correlaciona con la pérdida de la virulencia y el aumento de la susceptibilidad a la destrucción por los fagocitos; aunque no afecta la viabilidad. Muchas cepas bacterianas producen cápsula o limo, cuando son aisladas en cultivo por primera vez a partir de un huésped. Con los reaislamientos sucesivos, dejan de producirla, lo que indicaría que la presencia de la cápsula no ofrece ventaja selectiva in vitro. Su producción está regulada genéticamente, de forma que las bacterias la presentan cuando es necesaria para la supervivencia dentro del huésped.

La presencia de cápsulas también se puede demostrar por tinción negativa con tinta china. La tinta china no penetra la cápsula pero delimita un contorno refringente alrededor del cuerpo bacteriano en un fondo oscuro.

Los antígenos capsulares son muy útiles en la clasificación e identificación de diferentes bacterias, por ejemplo: *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, etc.

#### FIMBRIAS (PILI)

Las fimbrias o pili son estructuras filamentosas, proteicas, que se diferencian de los flagelos por su diámetro (menor a 8 nm), y por no poseer estructura helicoidal. No cumplen funciones de movilidad, y son estructuras variables, no vitales para las bacterias que las poseen.

Los pili comunes cumplen funciones de adherencia a receptores específicos y superficiales; esto es importante en las especies de relevancia clínica porque median la adherencia de muchas bacterias a determinados epitelios, jugando un papel fundamental en la colonización. Por ejemplo, las cepas de *Neisseria gonorrhoeae* patógenas, son aquellas que poseen fimbrias que se adhieren específicamente al epitelio uretral del hombre, o al epitelio del cérvix uterino de la mujer. Las cepas de *E. coli* capaces de causar infección urinaria, tienen fimbrias que les permiten adherirse específicamente al epitelio del aparato urinario. También *E. coli* enteropatógena (EPEC), tiene fimbrias que le permiten adherirse al epitelio intestinal para luego producir los cambios que determinarán la diarrea.

Existen otras estructuras llamadas pili sexuales que son más largos, y son dos o tres por célula. Estos intervienen en el intercambio genético entre bacterias, de allí su nombre. El apareamiento de dos bacterias y la transferencia de DNA a través del pili sexual se conoce como conjugación. Se transfiere material genético de una célula donadora (que posee un plásmido F que codifica el pili sexual, entre otras cosas) a una receptora. En general el material transferido es un plásmido, o una porción de cromosoma movilizada por un plásmido. Una vez unidas las bacterias, los pili sexuales se retraen, permitiendo que las células se “unan” y pase el DNA de la donadora a

la receptora, formándose una verdadera unión (puente) entre las membranas de las células para el pasaje del DNA. La célula receptora está estrechamente emparentada con la donadora, y posee un receptor específico para los pili sexuales.

#### FLAGELOS Y FILAMENTOS AXIALES

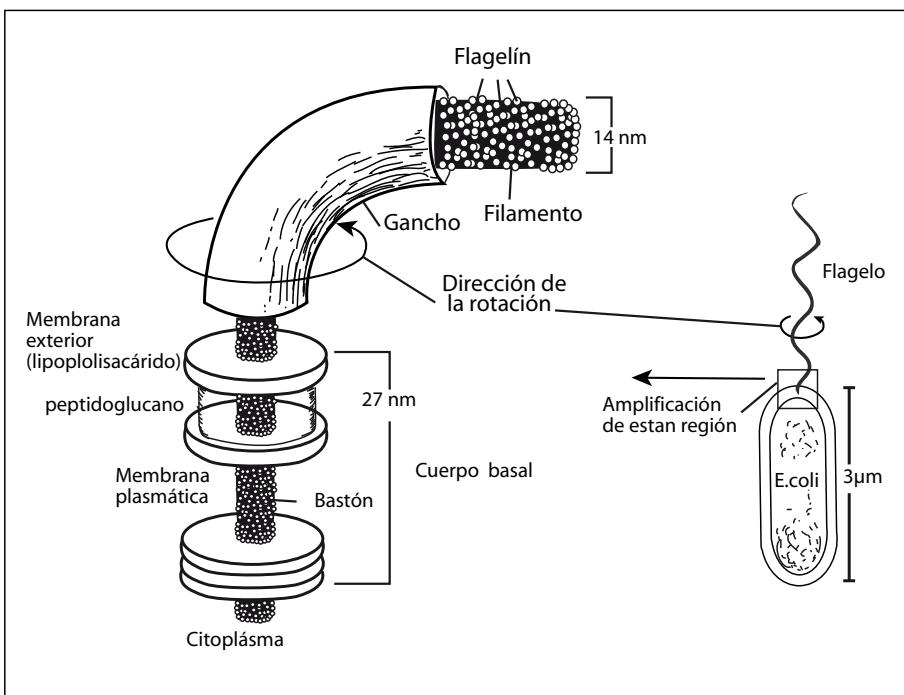
Los flagelos son filamentos proteicos, helicoidales, delgados y rígidos, de longitud y diámetro uniforme, responsables de la movilidad de la bacteria. Los flagelos son tan delgados que no pueden observarse directamente con un microscopio de campo claro, y deben teñirse con técnicas especiales para aumentar su grosor. La estructura detallada de un flagelo puede verse solo con el microscopio electrónico; así es que se ha demostrado que el flagelo bacteriano está compuesto de tres partes: el filamento, el gancho y el cuerpo basal. El primero sobresale de la superficie de la bacteria y se une a ese nivel con el gancho, que está fijo al cuerpo basal. Éste último está anclado en la membrana plasmática, y está compuesto por un cilindro y dos o más juegos de anillos contiguos a la membrana plasmática, el peptidoglicano, y en las bacterias Gram negativas también a la membrana externa (ver figura 2.8).

El filamento tiene forma de hélice rígida, y la bacteria se mueve cuando ésta gira, como las hélices de un barco. La dirección de la rotación flagelar determina la naturaleza del movimiento bacteriano, ya que la rotación de los flagelos en dirección contraria a las agujas del reloj permite el movimiento de avance, mientras que la rotación en el sentido de las agujas del reloj hace que las células den vueltas.

Los flagelos pueden variar en número, desde uno a cientos. Las especies bacte-

**Figura 2.8.**

Esquema comparativo de la estructura del flagelo en gramnegativas



rianas difieren por sus modelos de distribución de flagelos. Las monotípicas (*trichous*: pelo) tienen un solo flagelo que si se sitúa en un extremo de la bacteria y se denomina polar. Las bacterias anfípicas (*amphi*: en ambos lados) tienen un flagelo en cada polo bacteriano. Por otro lado las lofotípicas (*lopho*: mechón), poseen un grupo o penacho de flagelos en uno o ambos extremos. Por último, en las bacterias perirípicas (*peri*: alrededor), los flagelos se distribuyen uniformemente en toda la superficie bacteriana. Los modelos de distribución de los flagelos son útiles para identificar a las bacterias.

Los flagelos no son necesarios para la vida bacteriana. Su síntesis está regulada por las necesidades nutricionales o el estado energético, y ocurre por la adición de monómeros de flagelina al extremo distal de los flagelos en crecimiento. La síntesis del filamento es un ejemplo excelente de autoensamblaje, es decir que la información necesaria para construir el filamento está en la propia estructura de la subunidad de flagelina, y no colaboran enzimas especiales u otros factores. Las bacterias flageladas pueden buscar nutrientes o evitar los tóxicos siguiendo los gradientes; la función flagelar se debe a respuestas quimiotácticas, y la energía para el movimiento proviene de una corriente de protones.

La movilidad, y por lo tanto la presencia de flagelos, constituye un factor de virulencia.

El antígeno flagelar recibe el nombre de antígeno H. Las bacterias flageladas reaccionan con antisueros específicos para flagelos, provocando una aglutinación típica.

Las espiroquetas *Treponema*, *Leptospira* y *Borrelia*, se mueven en onda helicoidal; dicho movimiento les permite penetrar en medios viscosos. Estas bacterias tienen filamentos axiales que no se extienden de un polo a otro de la célula, sino que se originan en polos opuestos, y se superponen en el centro de la célula sin presentar conexiones entre sí.

## Esporos

Algunas bacterias Gram positivas pueden formar una estructura especial inactiva de resistencia, denominada endospora o espora. Éstas se desarrollan dentro de células bacterianas vegetativas (por eso la denominación de endospora), de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* entre otros.

Son resistentes a situaciones vitales estresantes como el calor, la desecación, la radiación ultravioleta, los ácidos y los desinfectantes químicos. Debido a su resistencia, y al hecho de que varias especies de bacterias formadoras de esporas son agentes patógenos peligrosos, las esporas tienen gran importancia en microbiología alimentaria, industrial, y médica. El conocimiento de estas formas altamente resistentes al calor, ya que pueden sobrevivir a la cocción durante una o más horas, fue esencial para el desarrollo de métodos adecuados de esterilización para medicamentos, alimentos, medios de cultivo microbiológicos, etc. En el ambiente las endosporas permiten la supervivencia de las bacterias, cuando la humedad o los nutrientes son escasos.

Se pueden observar con el microscopio óptico y electrónico. Como las esporas son impermeables a la mayoría de los colorantes, se observan como áreas incoloras dentro de las células coloreadas. Existen además coloraciones especiales para teñir los esporos. La situación de la espora en la célula madre o esporangio, es característica para una especie bacteriana determinada, siendo esto importante para la identificación de la bacteria. Las esporas pueden estar en el centro de la bacteria (*Clostridium perfringens*), próxima a un extremo o subterminal (*Clostridium botulinum*) o en el extremo, termi-

nales (*Clostridium tetani*). A veces la espora es tan grande que deforma el esporangio (*Clostridium botulinum*).

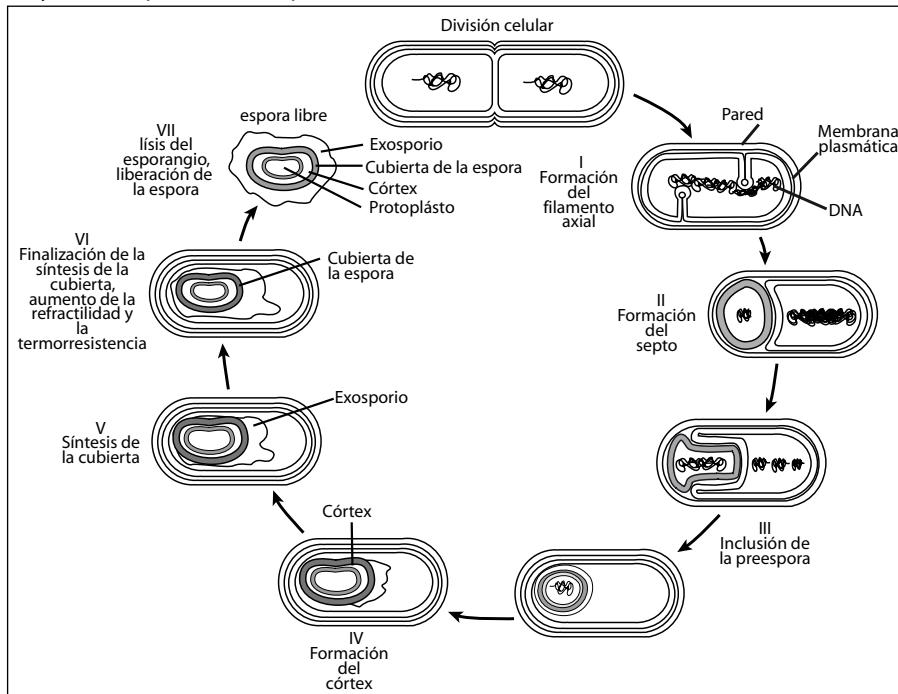
Dentro de una célula vegetativa se produce una espora única, que se diferencia de la célula madre en su morfología y composición, en el aumento de la resistencia a los ambientes adversos, y en la ausencia de actividad metabólica evidente. El proceso incluye la formación de numerosas cubiertas, y la captación de calcio con síntesis de ácido dipicolínico. Al final de la esporulación queda una partícula deshidratada que contiene DNA genómico. Ese DNA se vuelve resistente a la desecación, al calor extremo, a la radiación, y al ataque por la mayoría de las enzimas y agentes químicos. Pueden permanecer en esta forma por años o convertirse nuevamente en la forma vegetativa idéntica a la que les dio origen; este proceso recibe el nombre de germinación de la espora. La germinación se produce por el calentamiento suave o la presencia de nutrientes determinados; la espora capta agua, se hincha, se desprenden sus cubiertas, y se forma la célula vegetativa idéntica a la original. El ciclo vital de una bacteria productora de esporos se ilustra en la figura 2.9.

La estructura de la espora es compleja, y se distinguen de afuera hacia adentro el exosporio, capa delicada y delgada; la cubierta, compuesta por muchas capas de proteínas pudiendo ser gruesa; y la corteza, constituida por peptidoglicano modificado, con menos enlaces que en la célula vegetativa, y puede ocupar la mitad del volumen celular. Siguen a la corteza la pared celular de la espora rodeando al protoplasto, y el protoplasto, conteniendo las estructuras celulares normales como ribosomas y un nucleoide.

Aún no se ha determinado por qué la espora es tan resistente al calor y otros

**Figura 2.9.**

Esquema del proceso de esporulación



agentes letales. El 15% del peso seco de la espora consiste en ácido dipicolínico que forma complejos con iones de calcio. Quizá el complejo dipicolinato cálcico estabilice los ácidos nucleicos de las esporas. Recientemente se han descubierto en endosporas, proteínas pequeñas, solubles en ácido que se unen específicamente al DNA, lo saturan y lo protegen del calor, la radiación, la desecación, y las sustancias químicas. La deshidratación del protoplasto parece ser muy importante en la resistencia al calor. La corteza puede eliminar osmóticamente el agua del protoplasto, y proteger así a la célula del calor y la radiación. En resumen, la resistencia al calor de las endosporas se produce por: estabilización del DNA por dipicolinato cálcico y proteínas solubles en ácido, deshidratación del protoplasto, y mayor estabilidad de las proteínas celulares en bacterias adaptadas a crecer a temperaturas elevadas, entre otras.

La formación de esporas, esporogénesis o esporulación, comienza cuando cesa el crecimiento debido a una falta de nutrientes. Los cambios que ocurren durante la esporulación son el resultado del cese de la función de ciertos genes vegetativos, y de la expresión de nuevos genes. La formación de esporos se regula negativamente, y la célula elabora un represor a partir de algún componente del medio, que impide la iniciación de la esporulación. Cuando este compuesto se agota, se libera la inhibición y se inicia la esporulación. El factor específico que regula la iniciación de la esporulación es el trifosfato de guanosina (GTP). La disminución del pool de GTP es suficiente para iniciar la esporulación en algunas especies bacterianas estudiadas.

La transformación de esporas inactivas en células vegetativas es casi tan compleja como la esporulación. Se producen tres fases que son activación, germinación, y crecimiento. La primera es un proceso reversible que se produce generalmente por calentamiento o por sustancias químicas. Una endospora no germinará satisfactoriamente, incluso en un medio rico en nutrientes, si no ha sido activada. En la germinación termina el estado de reposo de la espresa. Es un proceso irreversible desencadenado por la exposición del esporo activado a algunos nutrientes y otros estimulantes (alanina, otros aminoácidos, nucleósidos y glucosa). Se caracteriza por hinchazón de la espresa, rotura o absorción de la cubierta de ésta, pérdida de la resistencia al calor y otros factores estresantes, pérdida de la refractariedad, liberación de los componentes de la espresa, y aumento de la actividad metabólica. Por último, en el crecimiento, el protoplasto de la espresa sintetiza nuevos componentes, emerge a partir de los restos de la cubierta de la espresa, y se transforma nuevamente en una bacteria activa.

## BIBLIOGRAFÍA

- Prescott, Harley, Klein. *Microbiología*. 4<sup>a</sup> ed. Mc Graw-Hill Interamericana de España. 1999.
- Schaechter M, Medoff G, Eisenstein BI, Guerra H. *Microbiología. Mecanismos de las enfermedades infecciosas*. 2<sup>a</sup> ed. Buenos Aires: Ed Panamericana; 1993
- Joklik WK, Willett H P, Amos DB, Wilgert CM, Zinsser ,editors. *Microbiología*. 20<sup>a</sup> ed. Bs.As: Panamericana; 1994.



# 3

# Fisiología y metabolismo bacteriano

*I. Bado, V. García, G. Grotiuz, G. Varela*

Un sistema vivo se caracteriza por la capacidad de dirigir las reacciones químicas y organizar las moléculas en estructuras específicas. Las células microbianas están constituidas por sustancias químicas como proteínas, polisacáridos, lípidos, y ácidos nucleicos, entre otros.

En este sentido, el crecimiento bacteriano se define como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de la célula. Es un proceso complejo que supone la replicación de todas las estructuras y componentes celulares, a partir de nutrientes exógenos.

El estudio del metabolismo celular es esencial para comprender la bioquímica del crecimiento microbiano. El término metabolismo se refiere a todos los procesos químicos que tienen lugar dentro de una célula, mientras que el término fisiología hace referencia al estudio de las funciones celulares.

El conocimiento de la fisiología y del metabolismo permite conocer el modo de vida, y el hábitat de las distintas especies bacterianas, lo que cobra importancia ya que el hombre ofrece una variedad de nichos ecológicos. A su vez, facilita la elaboración de medios de cultivo para el aislamiento y la identificación de microorganismos, así como también nos permite conocer y entender el modo de acción de algunos antibióticos que bloquean una vía metabólica o la síntesis de alguna macromolécula esencial para la bacteria.

## CRECIMIENTO BACTERIANO

El crecimiento bacteriano puede ser definido como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de la célula. Las condiciones físicas y químicas del medio donde el microorganismo se encuentra, afectan marcadamente sus actividades. La comprensión de como influye el ambiente sobre el crecimiento nos ayuda a explicar la distribución de los microorganismos en la naturaleza, y hace posible diseñar estrategias que favorezcan el crecimiento o que nos permita controlarlo.

Las bacterias como grupo, son extremadamente versátiles y tienen gran capacidad para utilizar una amplia gama de nutrientes, que van desde compuestos inorgánicos simples, a compuestos orgánicos más complejos.

Los nutrientes se pueden dividir en dos clases. Por un lado los nutrientes esen-

ciales, sin los cuales la célula no puede crecer, y por otro, los no esenciales, que se utilizan cuando están presentes pero no son indispensables. Algunos nutrientes son usados solo como precursores de macromoléculas celulares, otros solo como fuente de energía sin ser incorporados directamente al material celular, y otros cumplen las dos funciones al mismo tiempo. La glucosa, por ejemplo, es usada como fuente de carbono y de energía.

También se pueden clasificar como macronutrientes y micronutrientes según la cantidad requerida.

### **Macronutrientes**

Los macronutrientes más importantes son: carbono, nitrógeno, fósforo, oxígeno e hidrógeno.

El carbono (C) es el mayor constituyente de la célula bacteriana, por lo que es requerido en mayores cantidades que otros nutrientes. Según la forma en que es utilizado, existen fundamentalmente dos tipos de bacterias: autótrofas y heterótrofas. Las primeras son capaces de sintetizar todos sus componentes orgánicos a partir de compuestos inorgánicos como el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), como por ejemplo las bacterias que habitan el suelo. En cambio, las bacterias heterótrofas necesitan sustancias orgánicas como fuente de carbono. En este grupo se encuentran todas las bacterias de interés médico.

Después del carbono, el elemento más abundante en la célula es el nitrógeno (N), que representa entre el 12 y el 15% del peso seco. Es el constituyente principal de las proteínas y los ácidos nucleicos. La mayoría de las bacterias son capaces de usar el amonio como fuente de nitrógeno, mientras que otras pueden usar los nitratos. La reducción de nitratos, se puede lograr por dos mecanismos diferentes: reducción asimiladora, en la cual se reduce por la vía del nitrito; y reducción desasimiladora, donde el nitrato sirve como aceptor final de electrones (común en bacterias anaerobias y anaerobias facultativas).

El fósforo (P) es usado para la síntesis de ácidos nucleicos y de fosfolípidos. La mayoría de las bacterias lo usan en forma inorgánica como fosfato ( $\text{PO}_4^{2-}$ ). Los fosfatos orgánicos si bien están distribuidos ampliamente en la naturaleza, para ser usados deben ser atacados primero por fosfatasas, enzimas que clivan estos compuestos liberando el fósforo inorgánico.

La exigencias del oxígeno (O) demuestran el mecanismo que utilizan las bacterias para satisfacer sus necesidades energéticas (se comentará mas adelante).

El hidrógeno (H) es un átomo que forma parte de la mayoría de las macromoléculas presentes en la célula bacteriana.

Otros macronutrientes son: magnesio (Mg), que estabiliza los ribosomas, membrana citoplasmática y ácidos nucleicos, y también es utilizado como cofactor enzimático; azufre (S), presente en aminoácidos y vitaminas; potasio (K), necesario para una gran diversidad de enzimas; calcio (Ca), que estabiliza la pared celular y actúa en la termoresistencia de la endospora; sodio (Na), que es requerido por algunos microorganismos y hierro (Fe), fundamental en la respiración celular.

### **Micronutrientes**

Aunque requeridos en cantidades muy pequeñas, los micronutrientes son importantes para la nutrición de la bacteria. Son metales muchos de los cuales forman parte de

enzimas. Entre estos destacamos: cobalto (Co), cobre (Cu), manganeso (Mn), cromo (Cr), y molibdeno (Mo).

### Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son compuestos orgánicos que son requeridos en muy pequeñas cantidades y solo por algunas células. Estas sustancias incluyen vitaminas del complejo B, aminoácidos, purinas y pirimidinas. Aunque la mayoría de los microorganismos son capaces de sintetizarlos, otros requieren tomarlos preformados del medio ambiente. En este sentido, si las bacterias no requieren estos factores se denominan prototróficas, mientras que si los requieren se denominan auxotróficas para el factor en cuestión.

## Requerimientos atmosféricos y ambientales

### OXÍGENO

Las exigencias de oxígeno de una bacteria en particular, reflejan el tipo de metabolismo productor de energía. Según su relación con el oxígeno, existen bacterias anaerobias obligadas, anaerobias-aerobias facultativas (AAF), aerobias obligadas y microaerófilas.

Dentro de las bacterias anaerobias obligadas, se encuentran las estrictas y las aerotolerantes. Las estrictas, crecen en ausencia de oxígeno, el cual es muy tóxico e incluso letal frente a pequeñas exposiciones, mientras que, las aerotolerantes también crecen en ausencia de oxígeno, pero toleran una breve exposición al mismo como es el ejemplo de *Clostridium* spp. Las bacterias anaerobias-aerobias facultativas, son capaces de crecer en presencia o en ausencia de oxígeno (ejemplo *Enterobacteriaceae*). Las aerobias obligadas, requieren oxígeno para su desarrollo como es el caso de *Pseudomonas* spp.. Por último, las microaerófilas crecen mejor con presiones de oxígeno menores (3-5%) en comparación con la ambiental (21%), ejemplo *Campylobacter* spp..

Las bacterias aerobias, anaerobias facultativas y anaerobias aerotolerantes, poseen la enzima superóxido dismutasa que impide la acumulación del radical superóxido, produciendo peróxido de hidrógeno. Éste es eliminado por la acción de la enzima catalasa y peroxidasa, a oxígeno molecular y agua. La superóxido dismutasa no se encuentra presente en las bacterias anaerobias estrictas.

En el laboratorio de microbiología, los requerimientos de oxígeno de una cepa bacteriana pueden determinarse cultivando la bacteria en caldo tioglicolato. Este medio es un caldo de enriquecimiento apropiado para casi todas las bacterias de interés médico. El ácido tioglicólico que contiene el medio, actúa como agente reductor que disminuye el potencial redox del medio, generando un gradiente de concentración de oxígeno a lo largo del tubo. En la superficie del medio, la concentración es similar a la atmosférica, y va disminuyendo gradualmente hasta que en el fondo del tubo no exista oxígeno disuelto. Las bacterias aerobias estrictas podrán crecer en la superficie del caldo, las microaerófilas crecerán a centímetros de la superficie, las AAF crecerán en todo el tubo, mientras que las anaerobias lo harán en el fondo del mismo.

### ANHÍDRIDO CARBÓNICO

Algunas bacterias como *Neisseria* spp. y *S. pneumoniae*, requieren una concentración de CO<sub>2</sub> de 5 al 10%, mayor a la encontrada en la atmósfera (0.03%). Estas bacterias

se denominan capnófilas y sus requerimientos atmosféricos deben ser tenidos en cuenta a la hora de realizar el cultivo.

#### POTENCIAL DE OXIDACIÓN-REDUCCIÓN

El potencial oxidación-reducción es un requerimiento físico del medio de cultivo que resulta crítico para el crecimiento bacteriano en un determinado medio. Para la mayoría de los medios de cultivo, en contacto con el aire, el potencial de oxidación-reducción es de 0,2 a 0,4V, a pH 7. Las bacterias anaerobias obligadas son incapaces de crecer a menos que el potencial sea de -0,2V. Para establecer dichas condiciones en un medio de cultivo se puede eliminar el oxígeno, recurriendo a sistemas de cultivo anaerobio, o agregando al medio compuestos que contengan sulfhidrilo, por ejemplo el tioglicolato de sodio.

#### TEMPERATURA

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que influyen en la proliferación y mantenimiento de la vitalidad de los microorganismos. Cada bacteria tiene su temperatura mínima, por debajo de la cual no puede proliferar; temperatura óptima, en la cual el crecimiento es el más rápido posible; y temperatura máxima, por encima de la cual no existe crecimiento. Así, se pueden distinguir tres grupos de bacterias según el rango de temperatura en el cual es posible su multiplicación:

- psicrófilas, crecen entre -5 y 30°C, temperatura óptima 15°C;
- mesófilas, crecen entre 10 y 45°C, temperatura óptima 30°C;
- termófilas, crecen entre 25 y 80°C, temperatura óptima 55°C.

En el laboratorio se puede determinar la temperatura óptima de crecimiento, sembrando la cepa en estudio en un medio de cultivo adecuado, e incubándolo a diferentes temperaturas, para después evaluar los rendimientos obtenidos en las distintas condiciones.

Si bien la mayoría de los microorganismos de interés médico son mesófilos, pueden existir diferencias entre las temperaturas de crecimiento óptimas de los mismos, siendo para la mayoría una temperatura de 35 a 37°C.

#### CONCENTRACIONES DE HIDRÓGENO

Las bacterias tienen un rango de pH en el cual pueden crecer, y un pH óptimo bien definido. Según en el pH que se obtenga mayor rendimiento encontramos microorganismos:

- acidófilos, pH óptimo de crecimiento 6,5-7,0;
- neutrófilos, pH óptimo de crecimiento 7,5-9,0;
- alcalófilos, pH óptimo de crecimiento 8,4-9,2.

Para la mayoría de las bacterias de interés médico, el pH óptimo es de 7,2-7,6. Sin embargo, algunos patógenos del hombre como *Mycobacterium tuberculosis* resisten valores muy bajos de pH.

Como las bacterias al multiplicarse y realizar sus funciones metabólicas suelen modificar el pH del medio, éste puede prepararse con amortiguadores de pH (buffer), los cuales mantienen el pH relativamente constante.

#### CONDICIONES OSMÓTICAS Y DISPONIBILIDAD DE AGUA

El agua es un requerimiento esencial para todo ser vivo, y su disponibilidad es un

factor importante que afecta el crecimiento de los microorganismos en sus ambientes naturales. Las sales y los azúcares disueltos en agua condicionan la disponibilidad de la misma para los seres vivos.

Generalmente los microorganismos se encuentran en ambientes con menor concentración de solutos que en el interior celular, por lo tanto el agua tiende a entrar a la célula por osmosis.

Por el contrario, si se encuentran en medios de baja actividad acuosa, el agua tenderá a salir de la célula. Así, encontramos bacterias que son capaces de crecer en:

- medios con altas concentraciones salinas (halófilas), como las bacterias que habitan en el mar.
- medios con altas concentraciones de azúcar (osmófilas) como las bacterias que son capaces de crecer en jaleas.
- medios muy secos (xerófilas).

Con excepción de las bacterias del género *Mycoplasma* y de las formas lyster (L) que no tienen pared celular, la mayoría de las bacterias tienen una tolerancia osmótica que les permite soportar grandes cambios de osmolaridad.

#### LUZ SOLAR

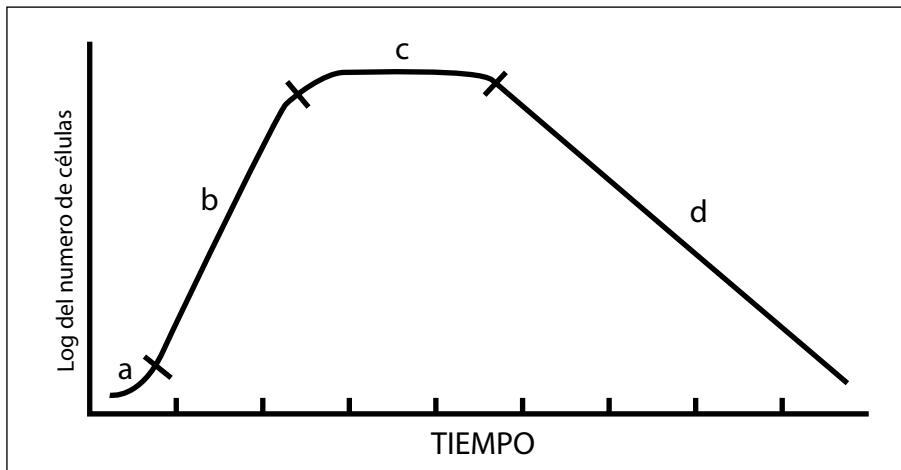
La luz solar directa interfiere con el crecimiento debido a que los rayos ultravioletas (UV) y las radiaciones ionizantes, son capaces de destruir las células bacterianas.

#### Crecimiento de las poblaciones bacterianas

El crecimiento se define como el aumento del número de bacterias en una población determinada (ver figura 3.1). Es importante diferenciar entre el crecimiento de una célula individual y el de una población. El crecimiento celular es el resultado del aumento del tamaño de la célula, seguido de su división. El crecimiento de una población, en cambio, es el resultado del aumento del número total de células, que puede ser cuantificado directamente contando el número de células, o indirectamente como por ejemplo midiendo la masa celular.

El recuento de células totales puede determinarse por recuento microscópico en una cámara con áreas de volumen conocido, contando las células por unidades. Este recuento, considera la totalidad de las células presentes en la muestra, viables y no viables. Para realizar un recuento de las células viables, es necesario hacer un cultivo en medio sólido para contar el número de unidades formadoras de colonias (UFC), presentes en un volumen conocido de la muestra. Dicha técnica puede realizarse por siembra en la superficie de un medio apropiado, o por siembra incorporada en agar.

El crecimiento de las poblaciones bacterianas en un sistema de cultivo cerrado (sin entrada ni salida de los componentes del sistema), está limitado por el agotamiento de los nutrientes, o bien por la acumulación de productos tóxicos del metabolismo. Cuando las bacterias se siembran en el laboratorio en un medio líquido (por ejemplo en un tubo de ensayo), se trata de un sistema cerrado de cultivo. Si se toman muestras a intervalos regulares en diferentes tiempos de incubación, y se realiza un recuento del número de células viables por mililitro de cultivo, la representación gráfica de los datos (conteo de células viables en función del tiempo) dará la curva de crecimiento característica. Esta curva consta de cuatro fases: latencia, exponencial, estacionaria y muerte.

**Figura 3.1.****Curva de crecimiento bacteriano**

#### FASE DE LATENCIA

En esta fase las bacterias transferidas de un cultivo en fase estacionaria, a un medio fresco, sufren un cambio en su composición química antes de ser capaces de iniciar la multiplicación. Hay aumento de los componentes macromoleculares y de la actividad metabólica, casi sin división celular, asociado a un incremento de la susceptibilidad a los agentes físicos y químicos. Por lo tanto, la mal llamada fase de latencia implica intensa actividad metabólica.

#### FASE EXPONENCIAL

Aquí las células se dividen a velocidad constante, determinada por la naturaleza intrínseca de la bacteria y por las condiciones del medio. Existe gran aumento del número total de células viables, que puede ser expresado en forma exponencial. Próximo al final de esta fase, se produce la liberación de exotoxinas por las bacterias que las producen.

#### FASE ESTACIONARIA

Eventualmente el agotamiento de los nutrientes o la acumulación de productos tóxicos, determina el cese del crecimiento. Hay un equilibrio entre las bacterias que crecen y las que mueren (crecimiento críptico), donde se observa una meseta. Hacia el final de esta etapa, puede ocurrir la esporulación en aquellas bacterias que poseen este mecanismo de resistencia. En esta fase algunos microorganismos como *Bacillus* spp. y *Nocardia* spp., producen antibióticos (metabolismo secundario).

#### FASE DE MUERTE

Luego de la fase estacionaria, la tasa de muerte se incrementa, el número de bacterias viables disminuye rápidamente, y por lo tanto la curva de crecimiento declina.

Las características de la curva de crecimiento pueden variar, dependiendo de las características propias del microorganismo, del estado metabólico del inoculo, del medio de cultivo y de las condiciones de incubación. La comprensión de cómo influye el ambiente en el crecimiento, nos ayuda a explicar la distribución de los microor-

ganismos en la naturaleza, y hace posible diseñar métodos que permitan estudiar y controlar el crecimiento bacteriano.

Además, existen sistemas de cultivo abiertos que son poco usados en el laboratorio de microbiología clínica. El cultivo continuo (con aporte y salida de nutrientes y requerimientos a una tasa constante), permite mantener a las bacterias en una misma fase de crecimiento durante un largo período de tiempo, por ejemplo en la fase estacionaria o en la exponencial.

## MEDIOS DE CULTIVO

El paso esencial para iniciar el estudio de una cepa bacteriana, es el cultivo. Este paso es importante para proveer de una población de bacterias que puedan ser analizadas mediante pruebas bioquímicas, serológicas, genéticas, y de susceptibilidad a los antibióticos.

El cultivo es el proceso de propagación de los microorganismos en el laboratorio, que se obtiene aportando las condiciones ambientales adecuadas, y los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano. Debemos recordar que algunas de las bacterias que causan infecciones en seres humanos, no son capaces de crecer en medios artificiales inertes (*Mycobacterium leprae*).

Es necesario conocer cuales son los requisitos básicos de la bacteria en cuestión para su cultivo en el laboratorio (nutrientes, requerimientos atmosféricos y ambientales), así como los requisitos del tipo o tipos bacterianos que se necesite recuperar.

La siembra de un material que contiene bacterias en un medio sólido adecuado con la técnica de aislamiento, permite luego de un período adecuado de incubación, la recuperación de millones de bacterias agrupadas en colonias aisladas. Éstas pueden ser aisladas nuevamente en un nuevo medio para obtener un cultivo puro.

Los medios de cultivo son una mezcla equilibrada de nutrientes, requeridos a concentraciones que permiten el crecimiento de los microorganismos. Deben contener todos los nutrientes necesarios en cantidades apropiadas a los requerimientos de los microorganismos, y en condiciones de pH, presión osmótica, oxígeno disuelto, etc., adecuados para el crecimiento.

Los medios más simples están compuestos por una base mineral, y se pueden complementar con una fuente de carbono, de energía, de nitrógeno, y con algún factor de crecimiento requerido.

Los medios deben esterilizarse antes de ser usados. Esta esterilización generalmente se realiza con calor húmedo, pero algunos medios con componentes sensibles al calor pueden filtrarse.

Los medios de cultivo se clasifican de la siguiente manera:

- según consistencia: líquidos, semisólidos (0,7% de agar), y sólidos (1,5% de agar). Los medios sólidos son usados para el aislamiento bacteriano, mientras que los líquidos son útiles para el enriquecimiento de una población bacteriana de interés;
- según composición: definidos (de composición química conocida, medios simples), y complejos (de composición no definidas, ejemplo extracto de levadura);
- según cantidad de nutrientes: mínimo (ejemplo agar simple), ricos (ejemplo agar sangre), y muy ricos (ejemplo agar chocolate);
- medios diferenciales: permiten diferenciar algunas propiedades distintivas del grupo bacteriano (ejemplo utilización de lactosa en agar CLED);

- medios selectivos: permiten el desarrollo de algunos microorganismos pero no de otros (ejemplo Thayer Martin);
- medios selectivos y diferenciales: es una combinación de los medios anteriores (ejemplo Mc Conkey lactosa);
- medios especiales: para el transporte de muestras;
- medios de identificación: ponen de manifiesto la utilización de un sustrato, producto, vía metabólica (ejemplo SIM, TSI, LIA, citrato, entre otros).

## CAPTACIÓN DE NUTRIENTES

La concentración de solutos en el interior de una célula bacteriana es mayor que en el medio extracelular. La principal barrera para el paso de solutos entre la célula y el medio externo es la membrana celular.

Las bacterias están rodeadas de membranas semipermeables, compuestas por una mezcla compleja de proteínas, lípidos y glicoproteínas, que restringen el ingreso de la mayoría de los solutos. Sin embargo, tienen sistemas que permiten el transporte de sustancias pequeñas a través de dichas membranas. Las moléculas de mayor tamaño primero deben ser degradadas a moléculas más pequeñas por enzimas (exoenzimas), producidas por la bacteria y secretadas al exterior celular. En las bacterias Gram negativas estas exoenzimas se encuentran fundamentalmente en el espacio periplásmico (espacio virtual ubicado entre la membrana externa y la membrana plasmática), mientras que en las bacterias Gram positivas están ancladas en la membrana plasmática. Dichas enzimas son activas sobre proteínas, polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos, entre otros. Bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, y *Clostridium perfringens*, elaboran algunas de estas enzimas que contribuyen a la virulencia, destruyendo los componentes vitales de los tejidos del huésped infectado. Estas enzimas pueden ser de expresión constitutiva (se sintetizan siempre), o inducibles (se sintetizan solo cuando está presente el substrato).

Con excepción del agua y el amonio que ingresan a la célula por difusión pasiva, en respuesta a un gradiente de concentración a ambos lados de la membrana, el resto de los metabolitos lo hacen por sistemas de transporte más específicos.

Estos sistemas de transporte son:

- *Porinas y canales de maltosa*. No requieren consumo de energía. Las porinas son sistemas inespecíficos que permiten el ingreso de moléculas pequeñas (peso molecular menor o igual a 6 kD), de naturaleza proteica e hidrofílicas, ubicadas en la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Los canales de maltosa se expresan en presencia de maltosa, y permiten el transporte al interior celular de éste disacárido, y compuestos derivados.
- *Difusión facilitada*. Una proteína asociada a la membrana celular facilita el equilibrio a ambos lados de la misma, actuando en conjunto con una quinasa citoplasmática dependiente de ATP. Estas proteínas de membrana se denominan permeasas, y muchas son inducidas por el sustrato a ser transportado. Cuando la sustancia es fosforilada por la quinasa citoplasmática, queda atrapada dentro de la célula. La difusión facilitada se parece a la difusión simple, porque el substrato se mueve por un gradiente de concentración (de mayor a menor), por lo tanto el proceso de transporte no requiere energía. La diferencia que tiene con la difusión pasiva, es que está mediada por una proteína transportadora, es más rápida, y tiene mayor especificidad de sustrato.

- *Transporte asociado al consumo de energía.* Permite que los solutos ingresen a la célula en contra de un gradiente de concentración, consumiendo energía metabólica. Implica la translocación de grupo, proceso en el que se modifica químicamente la sustancia; y el transporte activo, donde la sustancia a transportar no sufre modificación química. Un ejemplo de transporte activo es el sistema de la  $\beta$ -galactósido permeasa, mediante el cual la lactosa (disacárido) es concentrado dentro de *Escherichia coli*, a través de una permeasa específica (proteína M).
- *Captación y transporte de hierro.* Debido a que la mayor parte de las sales inorgánicas son altamente insolubles, muchos microorganismos producen agentes que unen hierro de una manera específica. Existen sistemas de transporte hacia el interior celular de baja y alta afinidad. Los de baja afinidad requieren concentraciones relativamente altas de hierro para su funcionamiento, y así alcanzar velocidades máximas de crecimiento. Los de alta afinidad actúan con concentraciones menores y son denominados sideróforos. Estos compuestos, son ligandos de bajo peso molecular, que solubilizan las sales de hierro transportándolo al interior celular. Se clasifican en dos tipos: cateoles (ejemplo enterobactina en *E. coli*); e hidroxamatos (producidos por algunos hongos).

## METABOLISMO

El metabolismo se produce por secuencias de reacciones catalizadas enzimáticamente, y se divide en anabolismo y catabolismo. El proceso por el cual la célula bacteriana sintetiza sus propios componentes se conoce como anabolismo, y resulta en la producción de nuevo material celular (biosíntesis). La biosíntesis es un proceso que requiere energía, por lo tanto las bacterias deben ser capaces de obtenerla de su entorno para crecer, y eventualmente multiplicarse. El conjunto de reacciones degradativas de los nutrientes para obtener energía o para convertirlos en unidades precursoras para la biosíntesis, se conoce como catabolismo. Entonces, el metabolismo es el resultado colectivo del catabolismo y el anabolismo.

La energía liberada como resultado de las reacciones de oxidación-reducción del catabolismo, debe ser almacenada y transportada. Una forma de almacenamiento es en compuestos con uniones fosfato de alta energía, donde dichos compuestos luego se utilizan como intermediarios, en la conversión de la energía conservada en energía útil. El compuesto fosfato de alta energía más importante en los seres vivos es el trifosfato de adenosina (ATP).

### Metabolismo productor de energía

Químicamente la oxidación está definida por la pérdida de electrones, y la reducción por la ganancia de los mismos. En las reacciones de oxido-reducción una sustancia se oxida, cede electrones (dadora), mientras que otra se reduce, acepta electrones (aceptora). En bioquímica, estas reacciones frecuentemente incluyen también la transferencia de átomos de hidrógeno, reacciones de deshidrogenación.

En las bacterias de interés médico, los sistemas de oxidación-reducción transforman la energía química de los nutrientes en una forma biológicamente útil. Dichos procesos incluyen la fermentación y la respiración. En la fermentación, tanto la molécula dadora como la aceptora de electrones son compuestos orgánicos. En cambio, en la respiración hay un acceptor final exógeno; donde en la respiración aerobia es el oxígeno, y en la respiración anaerobia otro compuesto inorgánico.

## METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO

En las bacterias se encuentran las tres vías centrales del metabolismo intermedio de los hidratos de carbono:

- *Vía glucolítica o de Embden Meyerhof Parnas.* La glucosa se convierte en piruvato en ausencia o presencia de oxígeno en dos etapas. En la primera etapa no hay oxidación, reducción, ni liberación de energía; y se da la formación de gliceraldehído 3'fosfato y dihidroxiacetona fosfato. En la segunda etapa ocurren reacciones de oxidación-reducción con liberación de energía y formación de dos moléculas de piruvato, y la ganancia son dos moléculas de NADH y dos moléculas de ATP.
- *Vía del fosfogluconato o shunt de las pentosas.* Es utilizada en la degradación de hexosas, pentosas y otros azúcares. Provee pentosas para la síntesis de moléculas tales como los nucleótidos, además de generar poder reductor en forma de NADPH. Su rendimiento energético equivale a una molécula de ATP por molécula de glucosa degradada.
- *Vía de Entner-Doudoroff.* Principal vía para degradar glucosa en bacterias aerobias estrictas como *Neisseria* spp. y *Pseudomonas* spp. Se forma una molécula de ATP.

El destino final del metabolito clave, el piruvato, puede ser fermentado a distintos compuestos o puede entrar en el ciclo de Krebs, para ser oxidado completamente a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ .

## FERMENTACIÓN

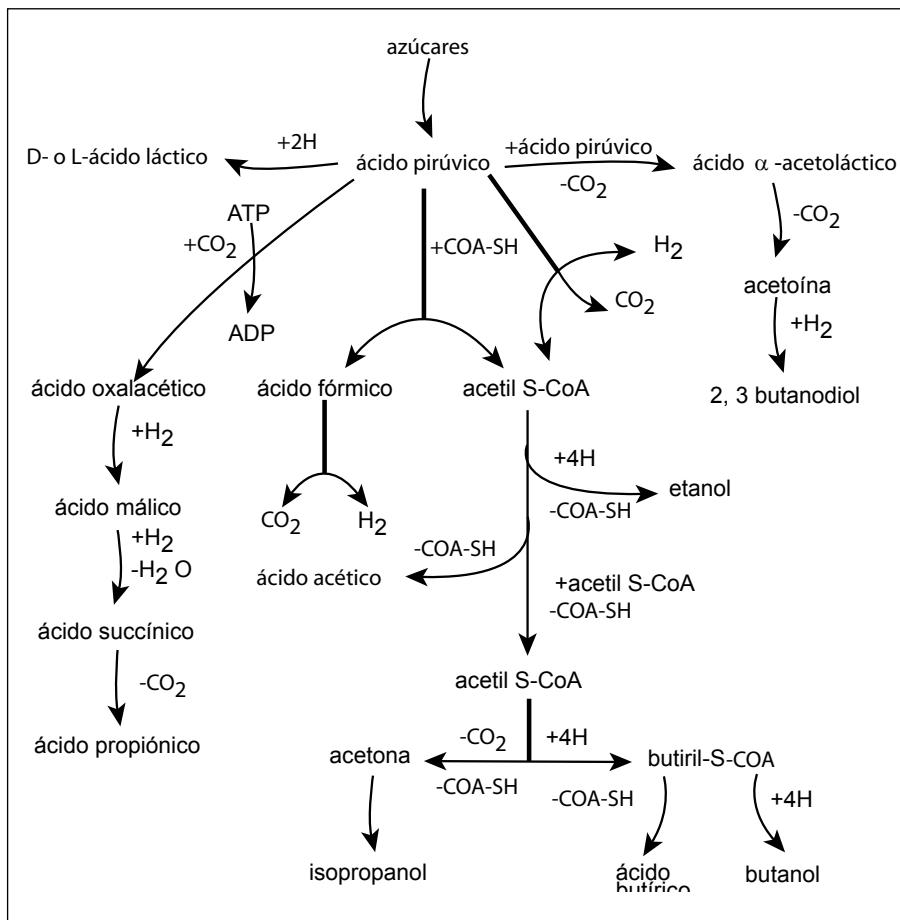
Ocurre en ausencia de un aceptor de electrones exógeno. El piruvato generado, es fermentado a distintos compuestos para regenerar la molécula de  $\text{NAD}^+$ , la cual fue reducida a NADH en las etapas previas de degradación de la glucosa.

Aunque hay distintos tipos de fermentaciones, todas llevan a una oxidación parcial de los átomos de carbono del sustrato inicial, y liberan una pequeña parte de la energía contenida en el compuesto de partida (ver figura 3.2). El rendimiento energético de este proceso es menor que en la respiración.

El estudio y el conocimiento de las fermentaciones bacterianas, tiene importancia práctica porque proporciona productos industriales útiles en el laboratorio, para identificar las diferentes especies. Entonces, según los productos finales, tenemos diferentes tipos de fermentación:

- Fermentación alcohólica: produce etanol a partir de piruvato.
- Fermentación homoláctica: el piruvato se reduce a ácido láctico por acción de la enzima láctico deshidrogenasa. (ejemplo *Streptococcus* spp.).
- Fermentación heteroláctica: la mitad de la glucosa se convierte en ácido láctico, el resto se transforma en una mezcla de  $\text{CO}_2$ , ácido fórmico, ácido acético, entre otros, (ejemplo *Lactobacillus* spp.).
- Fermentación propiónica: se obtiene ácido propiónico con la formación de una molécula de ATP (ejemplo *Propionibacterium* spp.).
- Fermentación ácido mixta: se obtiene ácido láctico, ácido acético, ácido succínico y ácido fórmico. Es característica de la mayoría de las enterobacterias (ejemplo *Shigella* spp., *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*).
- Fermentación butanodiólica: algunas bacterias producen 2,3-butanodiol durante la fermentación de la glucosa (ejemplo *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. y *Bacillus* spp.).
- Fermentación del ácido butírico: se forma ácido butírico,  $\text{CO}_2$ , e hidrógeno (ejemplo *Clostridium* spp.).

**Figura 3.2.**  
Rol central del piruvato en las fermentaciones



Si bien hasta ahora nos hemos referido solo a la fermentación de hidratos de carbono como procedimiento para obtener energía, debemos destacar que otros compuestos orgánicos pueden ser fermentados, por ejemplo aminoácidos (alanina, glicina). En microorganismos proteolíticos como *Clostridium difficile*, la fermentación de aminoácidos más característica es la reacción de Stickland.

Anteriormente hemos discutido el metabolismo de los hidratos de carbono en ausencia de un aceptor externo de electrones, y hemos visto que solo una pequeña parte de la energía potencial contenida en el sustrato es liberada. Esto se debe a que la diferencia entre los potenciales de oxidación reducción entre la molécula dadora inicial y la aceptora final, es muy pequeña. Otras bacterias tienen la capacidad de oxidar completamente el sustrato inicial a  $\text{CO}_2$  por el proceso conocido como respiración.

#### RESPIRACIÓN

La respiración aeróbica es el proceso por el cual un sustrato es oxidado completamente a  $\text{CO}_2$  y agua, con participación de un sistema transportador de electrones ubicado en la membrana plasmática, siendo el  $\text{O}_2$  el aceptor final de electrones.

El piruvato obtenido de la degradación de la glucosa es oxidado completamente a  $\text{CO}_2$  mediante el ciclo de Krebs (ver figura 3.3). Por cada molécula de piruvato oxidada en este ciclo, se generan tres moléculas de  $\text{CO}_2$ . Al igual que en la fermentación, los electrones generados en el ciclo de Krebs, pasan a coenzimas que tienen  $\text{NAD}^+$ . En la respiración aeróbica, los electrones del  $\text{NADH}$  son transferidos al oxígeno para regenerar  $\text{NAD}^+$  a través de un sistema transportador de electrones (en lugar de cederlos al piruvato como ocurre en la fermentación).

Este proceso ocurre en bacterias aerobias, microaerófilas y AAF.

En la respiración anaerobia ocurre el mismo proceso que en la respiración aerobia, con la excepción de que el aceptor final de electrones es un compuesto inorgánico distinto del oxígeno, como nitrato,  $\text{CO}_2$ , sulfatos, etc., o compuestos orgánicos como fumarato. Esta respiración la realizan las bacterias anaerobias y AAF.

El producto en la respiración de nitrato es muy tóxico. *Pseudomonas* spp. reducen el nitrato a nitrógeno molecular por medio de una serie de reacciones que se denominan en conjunto desnitritificación.

#### SISTEMAS TRANSPORTADORES DE ELECTRONES Y GENERACIÓN DE ATP

Estos sistemas están compuestos por transportadores (*carriers*) de electrones, asociados a la membrana plasmática, y tienen dos funciones básicas: aceptar electrones de un donador y cederlos a un aceptor, y conservar energía liberada durante ese transporte en forma de ATP por fosforilación oxidativa.

Existen varios tipos de enzimas de oxidación-reducción, que se reducen y oxidan alternativamente, y proteínas transportadoras de electrones, entre los que se destacan: NADH deshidrogenasas, flavoproteínas, citocromos y quinonas.

Las NADH deshidrogenasas aceptan átomos de hidrógeno a partir de NADH, y los transfieren a las flavoproteínas.

Las flavoproteínas contienen un derivado de la riboflavina como grupo prostético, la cual es conocida como vitamina B2, y es necesaria como factor de crecimiento por algunas bacterias.

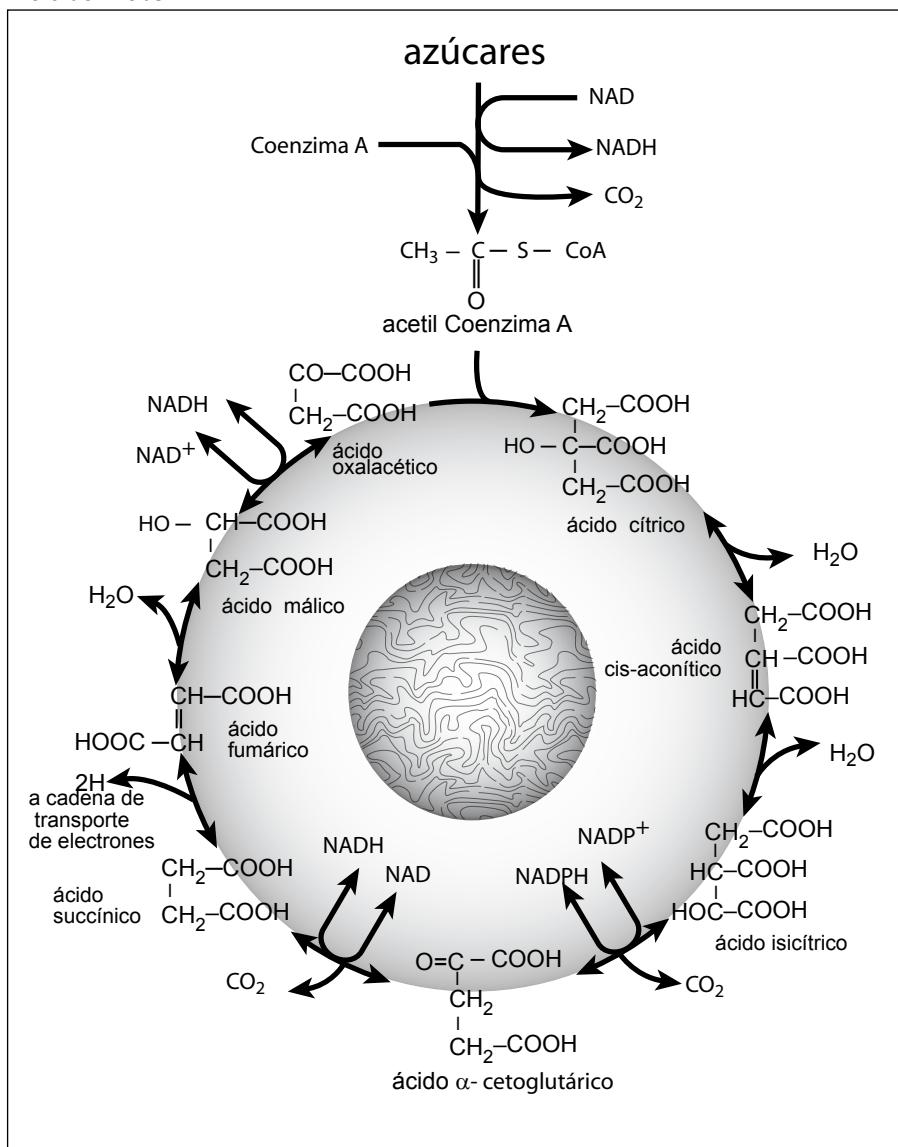
Los citocromos son proteínas que tienen anillos porfirínicos con hierro. Hay diferentes tipos de citocromos que se distinguen por sus potenciales de reducción. Se los designa con letras a, b, c, etc.

Las quinonas son sustancias liposolubles relacionadas con la vitamina K, que también participan en el transporte de electrones.

El sistema de transporte de electrones se encuentra en la membrana plasmática, de modo tal que durante el proceso de transporte hay una separación física entre protones ( $\text{H}^+$ ) y electrones. Los protones se ubican en el exterior celular, mientras que los electrones quedan en su interior; en consecuencia se genera un gradiente de pH y un potencial eléctrico a través de la membrana plasmática, estando el lado externo ácido y cargado positivamente, y el interno alcalino y cargado negativamente. A pesar de su pequeño tamaño, ni los protones ni los hidróxidos ( $\text{OH}^-$ ), atraviesan libremente la membrana; por lo tanto, el equilibrio no puede establecerse espontáneamente. Dicho estado energético de la membrana plasmática (fuerza protón-motriz), similar a una batería, puede ser usado por la célula para realizar un trabajo útil, por ejemplo movilidad o síntesis de ATP.

Para la síntesis de ATP un componente fundamental del proceso es una ATPasa de membrana; enzima que cataliza la reacción reversible entre difosfato de adenosina

**Figura 3.3.**  
**Ciclo de Krebs**

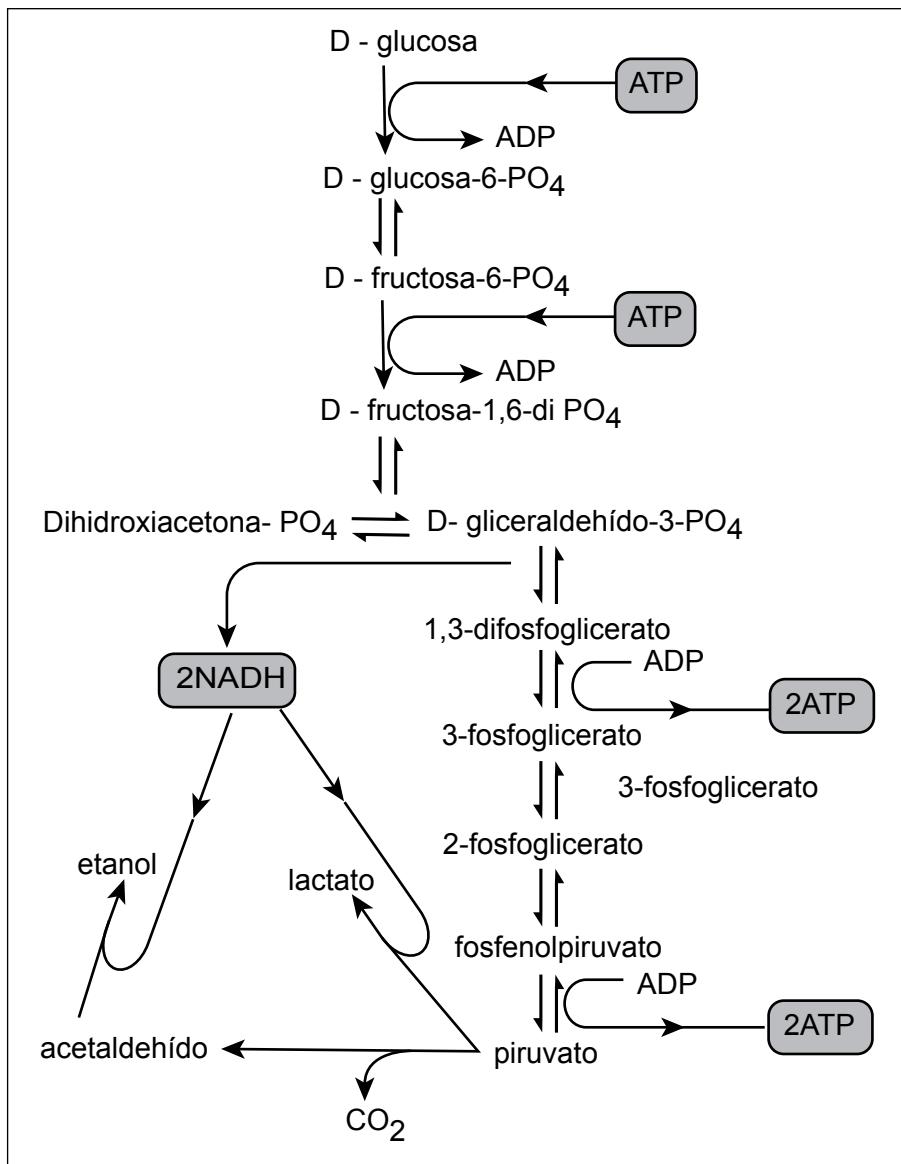


(ADP) y ATP. Operando en una dirección y usando el gradiente de protones, dicha enzima cataliza la formación de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico.

Existe una variedad de agentes químicos que afectan la síntesis de ATP y el flujo de electrones:

- desacopladores: inhiben la síntesis de ATP sin afectar a la ATPasa. Estos agentes son sustancias solubles en lípidos que incrementan la permeabilidad de la membrana, facilitando por tanto la pérdida de protones a través de la misma. Esto induce la pérdida de la fuerza protón-motriz, e inhibe la síntesis de ATP. Ejemplo de estos agentes son dicumarol y dinitrofenol;

**Figura 3.4.**  
**Glucólisis**



- inhibidores: bloquean el flujo de electrones, y por tanto la síntesis de ATP. Son ejemplos, cianuro o azida de sodio, monóxido de carbono, ácido sulfhídrico y polimixina B.

La polimixina B (un antibiótico), se adhiere específicamente a la superficie externa de la membrana, alterando su estructura y propiedades osmóticas. Se produce entonces la pérdida de metabolitos y la inhibición de algunos procesos bioquímicos que tienen lugar a ese nivel, como el transporte de electrones, y la síntesis de ATP entre otros.

Tanto los desacopladores como los inhibidores son venenos celulares que actúan en células eucariotas y procariotas.

#### BALANCE ENERGÉTICO DE LA RESPIRACIÓN

El resultado neto de las reacciones del ciclo de Krebs es la oxidación completa del piruvato a  $\text{CO}_2$ , con formación de cuatro moléculas de NADH y una de FADH. El NADH y el FADH pueden ser re-oxidados por el sistema transportador de electrones. Un total de 15 moléculas de ATP son sintetizadas en cada ciclo completo, por lo tanto, dado que cada molécula de glucosa rinde dos de piruvato, 30 moléculas de ATP son sintetizadas por cada molécula de glucosa que entra al ciclo de Krebs. Esto, sumado a las seis moléculas de la reoxidación del NADH y las dos de la vía glucolítica (ver figura 3.4), da un total de 38 moléculas de ATP por molécula de glucosa respirada. Además de sus funciones como mecanismo generador de energía, el ciclo de Krebs sirve como productor de metabolitos claves para la biosíntesis.

#### Regulación del metabolismo

Cada reacción metabólica está regulada con respecto a otras reacciones, y a la concentración de nutrientes en el medio. La regulación se realiza a diferentes niveles, en la actividad enzimática, y en la síntesis de las enzimas.

*Regulación de la actividad enzimática.* Se produce activación de enzimas alostéricas, inhibición por retroalimentación, y cooperatividad. En las bacterias anaerobias facultativas la fermentación (como única vía de producción de energía) es bloqueada en presencia de oxígeno, asegurando que el suministro de energía se produzca por respiración, que consume menos glucosa y acumula menos lactato. En este fenómeno denominado efecto Pasteur, la enzima fosfofructoquinasa es activada o inhibida según la relación entre el ATP y el ADP, regulando así el consumo de glucosa. Este es un ejemplo de regulación de la actividad enzimática por una enzima alostérica.

*Regulación de la síntesis de enzimas a nivel genómico.* Se da por inducción en presencia de sustrato o por represión. El ejemplo clásico de regulación de la síntesis de enzimas lo constituye el operón lactosa. Hay tres enzimas que participan en la utilización de la lactosa,  $\beta$ -galactosidasa, galactósido permeasa, y galactósido transacetilasa, las cuales tienen un promotor único. En ausencia de lactosa, la transcripción para estas enzimas está bloqueada por un represor, que se une al promotor inhibiendo la acción de la RNA polimerasa. Cuando se agrega lactosa al medio, ésta se une al represor, bloqueando de este modo su unión al promotor y permitiendo la acción de la RNA polimerasa, y la síntesis de las tres enzimas anteriormente mencionadas.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Editors Bailey & Scott's. Diagnostic Microbiology. 11th. ed. St. Louis, Missouri: Mosby; 2002.
- Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilgert CM. Editores Zinsser. Microbiología. 20<sup>a</sup> ed. Bs As: Panamericana; 1994.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J, Brock. Biología de los Microorganismos. 8<sup>th</sup> ed. Madrid 1999. Prentice Hall Iberia.



# 4 Genética bacteriana

*L. Betancor, M. P. Gadea, K. Flores*

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias son microorganismos con una capacidad extraordinaria de adaptación a diferentes condiciones ambientales. Para comprender la esencia de esta capacidad es importante conocer sus bases genéticas, es decir como está organizada la información genética, como realizan y regulan su expresión, y que mecanismos de variación génica poseen.

La capacidad infecciosa de las bacterias patógenas, radica en que poseen la información génica necesaria para colonizar los tejidos del huésped, invadirlos y/o producir sustancias tóxicas que causarán la enfermedad.

Por otro lado, el conocimiento del funcionamiento genético de las bacterias, sumado al hecho de que son de fácil manejo en el laboratorio y que tienen crecimiento rápido, ha permitido usarlas para sintetizar productos útiles a la medicina, tanto para el diagnóstico como para la prevención y tratamiento de algunas enfermedades. Estas posibilidades se han visto incrementadas con el desarrollo de la ingeniería genética y la disponibilidad de técnicas de biología molecular.

## ESTRUCTURA DEL GENOMA BACTERIANO

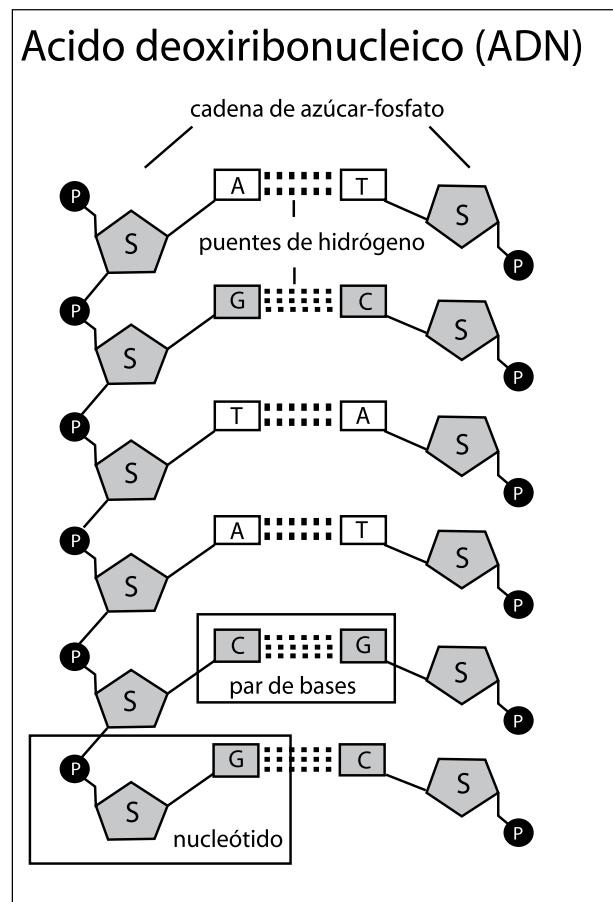
Toda la información genética esencial para la vida de la bacteria está contenida en una única molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA), de doble cadena y circular, cerrado por enlace covalente. Dicha molécula se denomina cromosoma bacteriano. Muchas bacterias poseen además DNA extracromosómico, también circular y cerrado, denominado DNA plasmídico por estar contenido en los plásmidos. Éstos portan información génica para muchas funciones, que no son esenciales para la célula en condiciones normales de crecimiento.

En términos bioquímicos la composición y estructura de los ácidos nucleicos bacterianos, es la misma que para cualquier célula. Conviene recordar brevemente, que los ácidos nucleicos son macromoléculas compuestas de nucleótidos, unidos en forma covalente por medio de enlaces fosfodiéster, entre los carbonos de las posiciones 3' y 5' de dos residuos de azúcares adyacentes. Esta estructura forma un esqueleto de azúcares y fosfatos constante en toda la macromolécula. La variación entre los nucleótidos que constituyen la cadena de ácido nucleico, esta dada por sus bases nitrogenadas, siendo las mismas para el DNA la adenina (A), timina (T), citocina (C), y guanina (G). Para el ácido ribonucleico (RNA) en lugar de timina está el uracilo (U). La A y G

se denominan bases púricas o purinas, mientras que T, U, y C se denominan bases pirimidínicas o pirimidinas. Así, una cadena o hebra de ácido nucleico, tendrá una estructura primaria determinada por la secuencia de las bases que la componen.

El DNA como macromolécula, está compuesto por dos cadenas nucleotídicas o hebras antiparalelas, que se enlazan entre sí formando una doble hélice. Los enlaces entre ambas hebras de DNA están determinados por puentes de hidrógeno entre las purinas de una cadena, con las pirimidinas de la otra. De esta forma, la A forma dos puentes de hidrógeno con la T, mientras que la C forma tres puentes de hidrógeno con la G. Dicho fenómeno se conoce como complementariedad de bases, es decir que la A es complementaria a la T, y la C lo es para la G (ver figura 4.1). Estos enlaces mantienen estable la estructura de doble hélice de DNA, en la cual se pueden distinguir pares de nucleótidos o pares de bases (pb). Estos pb pueden usarse como unidad de tamaño o longitud para las moléculas de DNA; de esta manera podemos decir por ejemplo que el DNA cromosómico de *Escherichia coli*, tiene un tamaño de 4,2 millones de pb, o lo que es lo mismo de 4.200 kilobases (kb).

Todas las células deben enfrentarse al problema de como lograr contener en su estructura, moléculas tan grandes como el DNA. Volviendo al ejemplo de *E. coli*, los 4.200 kb de su genoma implican una longitud de 1,3 mm, es decir unas mil veces

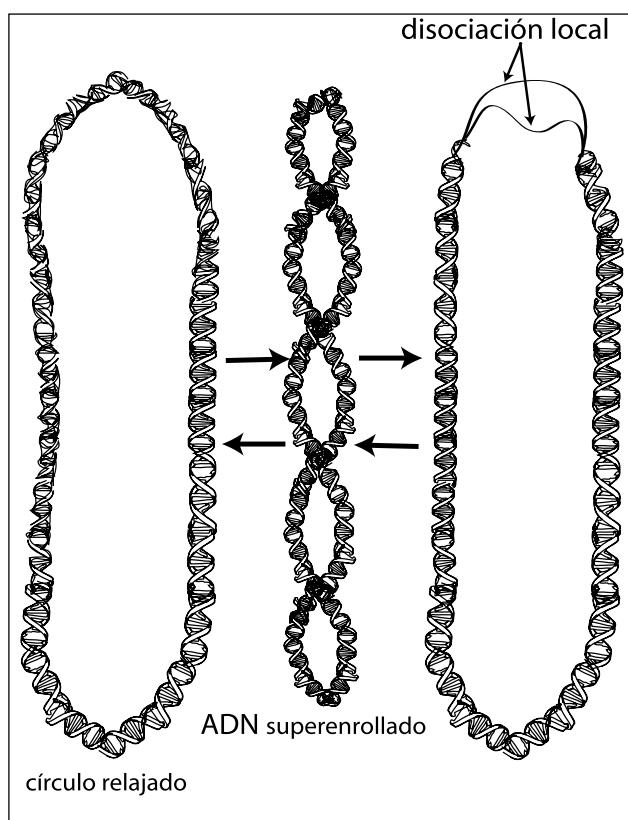


**Figura 4.1. Estructura del DNA.** Apareamiento de dos hebras de DNA basado en la complementariedad de bases. A (adenina) se aparea con T (timina) por medio de 2 puentes de hidrógeno, mientras que C (citocina) se aparea con G (guanina) por medio de 3 puentes de hidrógeno, formando los llamados "pares de bases".

la longitud de la célula. Las bacterias no poseen histonas asociadas a su genoma, y en consecuencia no tienen la posibilidad de compactar su DNA en estructuras tipo nucleosomas, como las células eucariotas. Por lo tanto, deben compactar su DNA de otra manera. Esto se logra porque el DNA circular cerrado es capaz de adoptar una estructura terciaria denominada superenrollamiento, que implica el enrollamiento del eje de la doble hélice sobre si mismo (ver figura 4.2). De este superenrollamiento decimos que tiene sentido negativo, porque tiene el sentido contrario al enrollamiento de una hebra de DNA sobre la otra. Esto supone para la bacteria, una fuente de almacenamiento de energía para ser usada en muchos procesos fisiológicos que la requieren, por ejemplo la separación de las dos hebras de DNA necesaria para la replicación y la transcripción.

El cromosoma bacteriano es suficientemente largo como para formar muchos lazos circulares, que como tales pueden superenrollarse formando una serie de dominios topológicos independientes. Esta organización en dominios colabora a la compactación general del genoma bacteriano, e impide que con la ruptura de una hebra (en cualquier sitio del cromosoma), se pierda el superenrollamiento total, manteniendo la energía almacenada.

Las bacterias poseen enzimas (topoisomerasas) capaces de alterar la estructura del DNA, modificando su superenrollamiento. Estas topoisomerasas actúan agregando o eliminando vueltas superhelicoidales, y cumplen un rol importante en los procesos de



**Figura 4.2.**  
**Superenrollamiento del DNA.** Una molécula de DNA circular relajado puede ser “retorcida” para formar una molécula superenrollada negativamente. Esta reacción es catalizada por una enzima “girasa”, mientras que la reacción inversa lo es por una “topoisomerasa”.

replicación y transcripción del DNA. Además, es interesante mencionar que algunas de las topoisomerasas como la DNA girasa, son blanco de acción de los antibióticos del grupo de las quinolonas, como el ácido nalidíxico.

## **LOS PLÁSMIDOS SON DNA EXTRACROMOSÓMICO**

Como ya dijimos, muchas bacterias poseen información génica contenida en moléculas de DNA distintas a las del cromosoma bacteriano, denominadas plásmidos. Éstos, son moléculas circulares de DNA de doble cadena, que constituyen una unidad de replicación independiente del cromosoma. Por esto puede encontrarse más de una copia del mismo plásmido dentro de la célula bacteriana. En general, los plásmidos de mayor tamaño se encuentran en una o unas pocas copias, mientras que los más pequeños pueden estar en hasta cien copias por célula (plásmidos multicopia).

Aunque el DNA plasmídico no porta información genética esencial para la vida de la bacteria, sí porta genes que le confieren nuevas propiedades fenotípicas, y que en algunos casos le son útiles para su adaptación al crecimiento en determinados ambientes.

Muchas bacterias potencialmente patógenas para el hombre, solo son capaces de comportarse como tales cuando portan un plásmido que contiene genes, que le permiten expresar moléculas de adhesión a los tejidos del huésped, o sintetizar sustancias tóxicas para éste. Como ejemplo encontramos la toxina tetánica producida por *Clostridium tetani*, codificada en un plásmido.

En otros casos, los plásmidos contienen genes que codifican enzimas capaces de degradar algunos antibióticos, permitiendo que la bacteria sobreviva a la acción de los mismos. Por ejemplo la producción de  $\beta$ -lactamasas por cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus*, y *Haemophilus influenzae*, está codificada en un plásmido.

Los plásmidos pueden clasificarse según distintos criterios, por ejemplo por su tamaño, su número de copia, o el tipo de genes que contiene (plásmidos de virulencia, plásmidos de resistencia a antibióticos, etc.). También pueden clasificarse en grupos de incompatibilidad; se dice que dos plásmidos pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad si son incapaces de coexistir en la misma bacteria. Muchos plásmidos, en general los de mayor tamaño que pueden portar hasta 50 o 100 genes, suelen ser capaces de transferirse de una bacteria a otra, mediante un proceso llamado conjugación (véase mas adelante). Estos plásmidos de conjugación codifican todos los factores necesarios para su transferencia. Algunos plásmidos mas pequeños, no conjugativos, pueden ser movilizados, es decir que poseen la secuencia necesaria para permitir su transferencia, pero ellos mismos no codifican las proteínas necesarias para ser transferidos. Por último, otros plásmidos no se transfieren en absoluto. La adquisición de DNA plasmídico por una cepa bacteriana, puede realizarse por medios distintos a la conjugación, como la transformación, transducción mediada por fagos, o la incorporación en el cromosoma, como veremos mas adelante.

## **REPLICACIÓN DEL DNA BACTERIANO**

El genoma completo de una célula, sea procariota o eucariota, debe replicarse con exactitud una vez por cada división celular. Por lo tanto, la iniciación de la replicación compromete a la célula a una división posterior. Si se inicia la replicación, la división

consiguiente no debe ocurrir hasta que se haya completado la replicación, y de hecho el final de la replicación puede disparar la división celular.

Las bacterias, a diferencia de las células eucariotas, son capaces de replicar su DNA a lo largo de todo su ciclo celular.

Se denomina replicón a cada unidad de replicación del DNA que contiene todos los elementos requeridos para regular este proceso.

El cromosoma bacteriano se replica a partir de un único origen, que se mueve linealmente hasta completar la duplicación total de la molécula, por lo que constituye un replicón. Esto facilita la regulación, que está centrada en la etapa de iniciación. Una vez que la replicación del cromosoma se inicia en su origen, todo el cromosoma será duplicado. Los plásmidos constituyen replicones independientes del cromosoma, generando una replicación por ciclo celular que se coordina con la replicación genómica (plásmidos unicopia), o permitiendo varias replicaciones por ciclo (plásmidos multicopia).

El sitio de DNA que se está duplicando se llama horquilla de replicación. La replicación puede ser unidireccional o bidireccional, según se formen una o dos horquillas en el origen. Generalmente, los cromosomas bacterianos tienen replicación bidireccional, mientras que algunos plásmidos pueden replicarse unidireccionalmente. En la replicación unidireccional, una horquilla sale del origen y progresiona a lo largo del DNA. En la bidireccional, se forman dos horquillas que se alejan del origen en direcciones opuestas, hasta que se encuentran completando la duplicación. Esto permite a la bacteria duplicar su DNA más rápido que si el proceso fuera unidireccional, pudiendo replicar más de mil pb por segundo. Es importante destacar que, aunque la velocidad de replicación es muy elevada, la fidelidad de la misma también es grande, siendo la frecuencia de mutaciones espontáneas del orden de una cada  $10^7$  a  $10^{11}$  pb replicados.

La replicación es semiconservativa, porque cada molécula de DNA posee una cadena del DNA original y una nueva. Esto resalta la importancia de la complementariedad de bases en la estructura del DNA (ver figura 4.3).

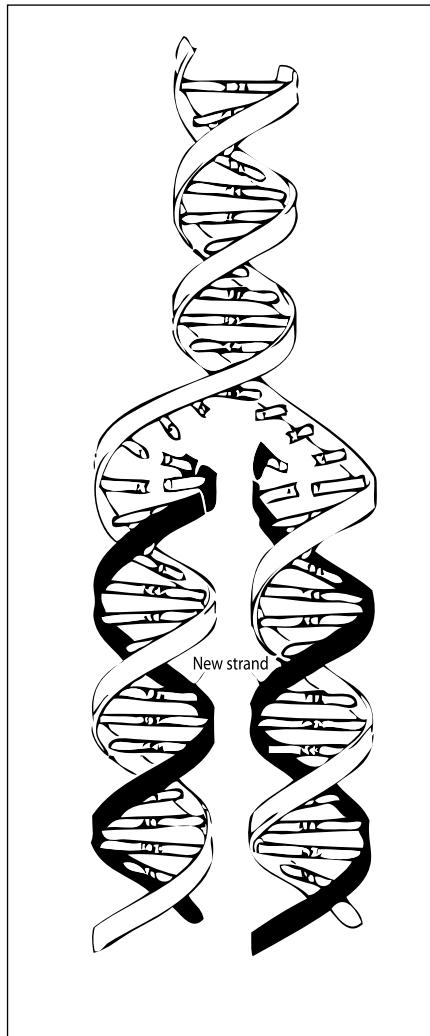
Las enzimas encargadas de catalizar el proceso de replicación, se denominan DNA polimerasas. Si bien en *E. coli* se conocen tres tipos distintos de DNA polimerasas, la responsable de la mayoría de los procesos de replicación es la polimerasa III, mientras que las polimerasas I y II cumplen principalmente funciones de reparación de rupturas, o de errores en las moléculas de DNA. También participan otras enzimas como las helicasas, responsables de “desenrollar” el DNA en el origen o cerca de él, paso indispensable para iniciar la replicación.

Esquemáticamente, podemos decir que la replicación consta de tres fases: iniciación, elongación y terminación. La primera se produce desde el origen del replicón donde se forma la o las horquillas de replicación, gracias a la acción de las helicasas que “desenrollan” el DNA. De esta forma se constituye una porción monocatenaria de DNA, que estará en condiciones de formar un complejo con proteínas de unión al DNA, encargadas de estabilizar la cadena sencilla, evitando la formación de puentes de hidrógeno. Se sintetiza un corto oligonucleótido de RNA con un grupo 3' oxidrilo libre, que actuará como cebador o *primer*, en el cual la DNA polimerasa agrega los nucleótidos.

La elongación consiste en el avance de la horquilla de replicación, conforme se van agregando nucleótidos a la nueva cadena, siguiendo un orden establecido por las reglas de complementariedad de bases (A con T y C con G), entre la cadena “molde” y

**Figura 4.3. Replicación del DNA.**

El proceso de replicación del DNA es semiconservativo, ya que cada nueva molécula posee una hebra sintetizada “de novo” apareada a su complementaria proveniente de la molécula que le dio origen. El proceso genera dos moléculas de DNA idénticas.



la nueva. En esta etapa participa fundamentalmente la DNA polimerasa III. Todas las polimerasas conocidas agregan nucleótidos en dirección 5' a 3' para el crecimiento de la cadena, y requieren una cadena de DNA molde, un cebador, y los nucleótidos (ver figura 4.4).

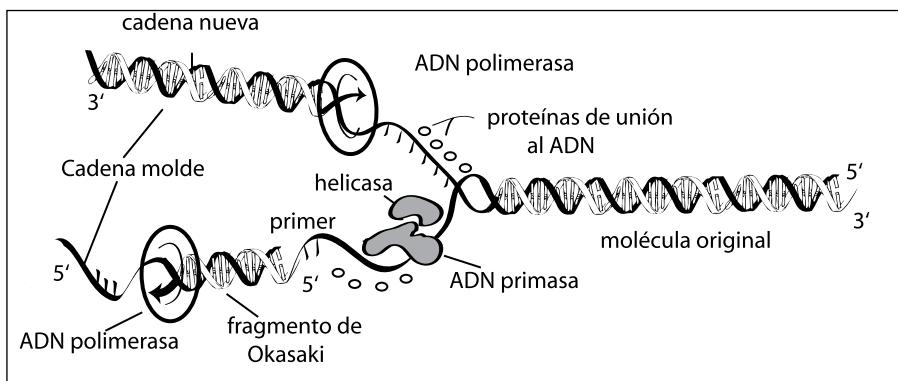
La terminación se produce, después de que ambas horquillas de replicación han atravesado la mitad del cromosoma en direcciones opuestas, y se encuentran en la región terminal del genoma. En esta región, existen secuencias de DNA que actúan como bloqueadores para el avance de las horquillas, por lo tanto se asegura que la replicación termine en esa pequeña porción del genoma.

### Expresión de los genes procariotas

#### TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN

La expresión genética de todas las células depende de los procesos secuenciales de

**Figura 4.4. Colaboración de proteínas en la horquilla de replicación.** La DNA polimerasa III necesita para iniciar la síntesis un cebador o primer que es sintetizado por una RNA polimerasa especial. Algunas proteínas desenrollan la hélice de DNA y otras se unen a los fragmentos de DNA unicatenario para estabilizarlo. Como la polimerasa solo sintetiza DNA en dirección 5' a 3', una de las cadenas se sintetiza en forma discontinua, dejando una serie de fragmentos de DNA y de huecos sin replicar. La DNA polimerasa I rellena los huecos y una enzima ligasa sella los fragmentos entre sí.



transcripción y traducción, que en conjunto transfieren la información contenida en una secuencia de nucleótidos de un gen, a una secuencia de aminoácidos de una proteína. Esto implica que a partir de la dotación génica portada por la célula (genotipo), se expresarán un conjunto de características que podremos evidenciar, y que constituirán el fenotipo celular.

Durante la transcripción, las reglas del apareamiento de bases son aplicadas por la RNA polimerasa, para sintetizar un producto complementario a una cadena del DNA usada como molde, que es el RNA. Una de las clases más importantes de RNA es el llamado RNA mensajero (RNAm), que porta la información para la síntesis de proteínas. La RNA polimerasa bacteriana, es distinta de la que tienen las células eucariotas; de hecho, algunos antibióticos que tienen como sitio blanco de acción la RNA polimerasa (por ejemplo la rifampicina), son efectivos exclusivamente ante células procariotas.

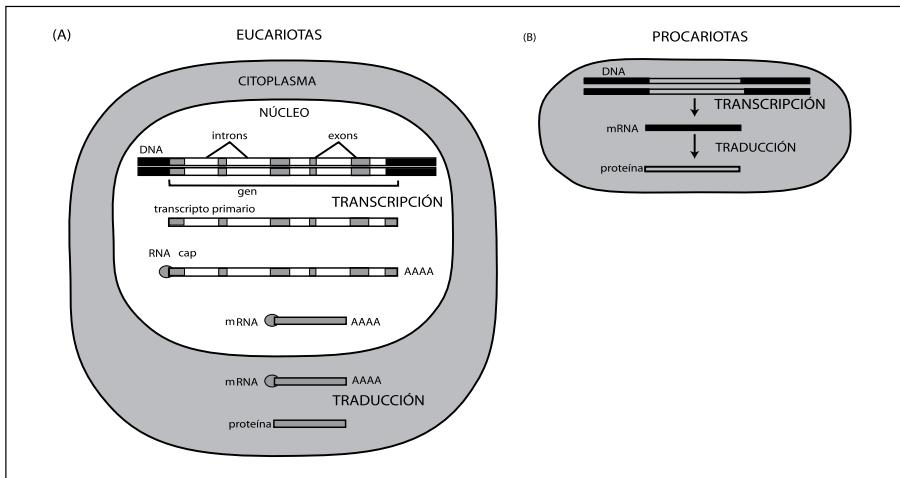
La RNA polimerasa reconoce un sitio específico en el DNA, llamado promotor, al cual se une iniciando la transcripción. Un mismo transcripto, RNAm, puede contener la información correspondiente a más de un gen, por lo tanto se traducirá luego en más de un polipéptido. El conjunto de genes que son transcritos en un único RNAm, y que por tanto se expresan en conjunto se denomina operón (ver más adelante).

Los genes procariotas no poseen intrones como los eucariotas, es decir que una vez transcripto el RNAm, éste será traducido directamente en una secuencia polipeptídica, sin necesidad de realizar ningún procesamiento después de la transcripción.

Otra diferencia importante con la expresión de los genes eucariotas, es que como las bacterias no tienen un compartimento nuclear definido, los procesos de transcripción y traducción están acoplados. Es decir, que mientras se está sintetizando una molécula de RNAm, el RNA naciente puede tomar contacto con los ribosomas e iniciar la síntesis proteica (ver figura 4.5). Esto es una ventaja para la bacteria, y constituye una importante causa de su elevada capacidad para adaptarse a diferentes ambientes, porque le permite responder rápidamente a los estímulos sintetizando las proteínas necesarias, en el momento adecuado.

**Figura 4.5. Comparación entre la expresión de los genes eucariotas y procariotas.**

Los RNAm procariotas son a menudo poligénicos, es decir que contienen información para más de una proteína. El extremo 5' se traduce cuando todavía se está transcribiendo el extremo 3'. Los RNAm eucariotas son monogénicos y requieren de modificaciones postranscripcionales antes de atravesar la membrana nuclear y llegar al citoplasma donde son traducidos.



La traducción es un proceso por el cual el RNA ribosómico, el RNA de transferencia (RNAt), y muchas proteínas ribosomales, realizan la “lectura” del código genético. Dicho código está “escrito” en tripletes de nucleótidos o codones portados por el RNAm. De la “escritura” de la secuencia correspondiente de aminoácidos, surge el producto polipeptídico. El ribosoma desempeña un rol fundamental, reuniendo al RNAm y a los RNAt cargados de aminoácidos.

La estructura y composición de los ribosomas procariotas (RNA y proteínas), difiere en cierta medida de los ribosomas eucariotas. Tienen menor masa y por lo tanto, menor coeficiente de sedimentación (la subunidad mayor 50 S y la menor 30 S, ambas suman 70 S). Estas diferencias entre los ribosomas procariotas y eucariotas, igual que otras diferencias en la expresión génica (polimerasas, topoisomerasas, proteínas, mecanismos regulatorios y factores de elongación), tienen una serie de implicancias. Una de éstas es la sensibilidad diferencial de procariotas y eucariotas a toxinas y antibióticos. Por ejemplo los macrólidos, los aminoglucósidos, el cloramfenicol y otros, son antibióticos que actúan en el ribosoma bacteriano o en el proceso de síntesis proteica. En cambio, algunas toxinas bacterianas como la diftérica, actúan selectivamente en la síntesis proteica eucariota.

Existen dos sitios en el ribosoma; por un lado encontramos el aceptor (sitio A), donde los RNAt cargados se asocian en primer lugar, y por otro el sitio peptídico (sitio P), donde se sujeta la cadena polipeptídica en crecimiento. En cada adición de aminoácidos, el RNAm avanza un codón y el nuevo aminoácido se traslada del sitio A al P, incorporándose a la proteína en formación.

Como el código genético es universal, el significado de los codones es similar al de los eucariotas, aunque cabe mencionar que existen algunas diferencias en los codones que determinan la iniciación, y la terminación de la traducción, así como en la preferencia de uso de ciertos codones.

Como en los procesos de replicación y transcripción, el paso inicial de la traducción es un importante punto de regulación.

## REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS BACTERIAS

Las bacterias tienen muchos mecanismos para controlar la expresión de sus miles de genes, con los cuales logran que el producto de un gen determinado, solo se sintetice cuando es necesario, y en lo posible en la cantidad óptima. Esto les confiere una importante capacidad de adaptación a cualquier cambio de concentración de nutrientes del medio en que habitan, activándose determinadas vías metabólicas solo cuando es necesario. Así, las bacterias evitan sintetizar enzimas cuando falta el sustrato correspondiente, pero siempre están preparadas para fabricarlas cuando aparece dicho sustrato en el entorno.

Un importante mecanismo de regulación desarrollado por las bacterias, se basa en la activación o inactivación de la transcripción de un grupo de genes, cuyos productos tienen funciones relacionadas, y están organizados en una región del genoma que permite regular su expresión. Esta forma de organización genética se denomina operón, y le permite a la célula administrar en forma óptima sus reservas energéticas.

Un operón consiste en un promotor, sitio blanco de la regulación; genes adyacentes que codifican cada una de las enzimas de una vía metabólica, y una secuencia de terminación de la transcripción. Así, todos los genes constituyentes de un operón son transcriptos de forma coordinada como RNAm policistrónico, es decir multigénico. Dicho RNAm es traducido secuencialmente en proteínas por los ribosomas.

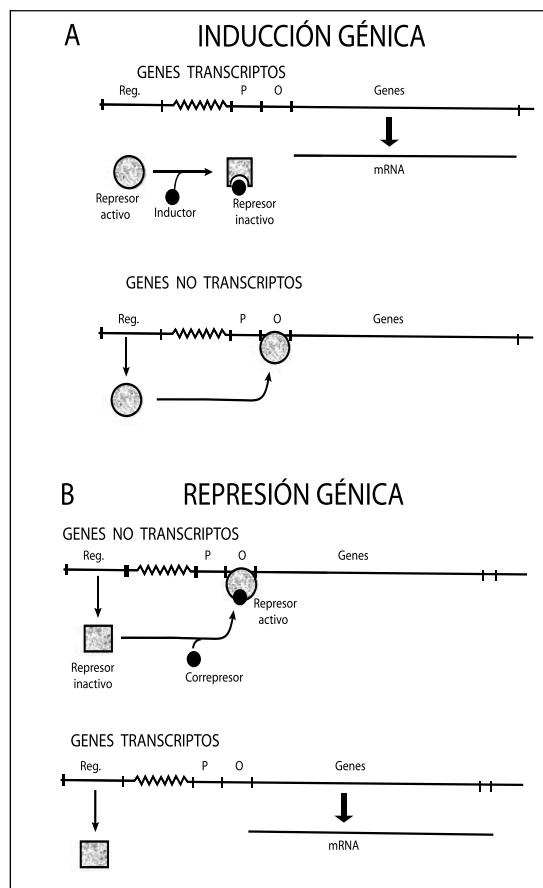
La iniciación de la transcripción puede regularse positiva o negativamente. Los genes bajo control negativo se expresan constantemente, excepto que sean inhibidos por una proteína represora que evitará la expresión del gen, por su unión a una secuencia específica del DNA, denominada operador. Este operador impide que la RNA polimerasa inicie la transcripción en el promotor.

Aquellos genes cuya expresión se encuentra bajo control positivo, no serán transcriptos excepto que esté presente una proteína activadora, que se une a una secuencia específica del DNA, y ayuda a la RNA polimerasa en los pasos iniciales de la transcripción.

Los operones pueden ser inducibles o reprimibles. Se considera inducible cuando la introducción de un sustrato en el medio, aumenta la expresión de las enzimas necesarias para su metabolismo. Éstos solo funcionan en presencia de una pequeña molécula, el inductor. Por otro lado, en el mecanismo de regulación por represión, disminuye la síntesis de algunas enzimas cuando existen cantidades suficientes de los productos terminales de la vía metabólica correspondiente. Esto se denomina represión por producto final, y los metabolitos terminales son moléculas llamadas co-represores (ver figura 4.6).

Un ejemplo clásico es el operón lactosa (*lac*), descrito en *E. coli*. Contiene un conjunto de genes, cuyos productos son las enzimas responsables de la degradación de la lactosa. En ausencia de lactosa en el medio, el operón es reprimido por la unión de una proteína represora a la secuencia del operador, y esto impide la acción de la RNA polimerasa. La adición de lactosa al medio anula dicha represión, dado que el propio azúcar actúa como inductor uniéndose a la proteína represora, e impidiendo que ésta continúe asociada al operador. Este mecanismo de control negativo, asegura que el operón *lac* se transcriba solo cuando hay lactosa en el medio. Sin embargo,

**Figura 4.6. Mecanismos de regulación de la expresión génica.** a) Inducción: Un gen regulador (reg) codifica para una proteína represora en su estado activo que se une al operador (O) bloqueando la unión de la RNA polimerasa al promotor (P). En presencia del inductor, la proteína represora es inactivada y el operador se encuentra disponible para el inicio de la transcripción. b) Represión: El gen regulador codifica para una proteína represora en su estado inactivo. En ausencia de la molécula correpresora, ocurre la transcripción. En presencia del correpresor, la proteína represora es activada para su unión al operador, bloqueando de este modo la transcripción.



existe un mecanismo para aumentar al máximo la expresión del operón lac, basada en un mecanismo de control positivo mediado por proteínas activadoras. En *E. coli* existe una proteína llamada proteína activadora del gen por el catabolito (PAC), que forma un complejo con el monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), y adquiere la capacidad de unirse a una secuencia específica del DNA presente en el promotor. La unión del complejo PAC-AMPc al DNA, potencia la unión de la RNA polimerasa al promotor, y permite aumentar la frecuencia de iniciación de la transcripción. Así, no solo se regula la síntesis, sino también la cantidad que se sintetiza, según los requerimientos de las enzimas responsables de la degradación de la lactosa. Este tipo de mecanismo regulador de la transcripción, se encuentra en muchas bacterias para diferentes vías metabólicas.

También existen operones que son regulados en la terminación de la transcripción, por un mecanismo especial llamado atenuación, que es característico de las vías biosintéticas de aminoácidos, y se basa en el acoplamiento entre transcripción y traducción. Este es el caso del operón triptófano (Trp), en el cual el promotor codifica un pequeño péptido que contiene Trp en posición crítica. Cuando hay suficiente

cantidad de este aminoácido en el medio, el péptido se sintetiza rápidamente a partir del promotor que es transcripto, y luego traducido. Esto provoca un cambio en la conformación del DNA correspondiente al operón, que permite reconocer una señal de terminación de la transcripción entre el promotor y los genes estructurales, sitio donde la RNA polimerasa se separa del DNA, y termina la transcripción. Por el contrario, cuando no hay suficiente Trp, el péptido no podrá sintetizarse, y la RNA polimerasa continuará transcribiendo los genes del operón. Así, la célula solo sintetizará el aminoácido, cuando no haya suficiente cantidad en el medio, para ser usado en las vías biosintéticas.

No solo en la transcripción existe regulación, también existe en la traducción, y luego de ella. La velocidad de la traducción de las diferentes secuencias de RNA transcriptos, puede variar más de mil veces según el sitio de unión del ribosoma con el mensajero. Generalmente, el control de la traducción se basa en la obstrucción del sitio de unión del ribosoma, ya sea por la unión de una proteína al RNA ribosómico en ese sitio, o por el apareamiento de bases de éste con otro fragmento de RNA. Este es el mecanismo usado para la regulación de la síntesis de las proteínas ribosomales, cuyos genes también se encuentran organizados en operones.

Por último, existe también la regulación posttraduccional, que la bacteria usa para inactivar enzimas innecesarias. Si bien existen mecanismos para suprimir la producción de enzimas cuando no son necesarias, hay que considerar que estas enzimas tienen una vida media relativamente larga y que en algunas ocasiones es más redituable energéticamente inactivar las enzimas de una vía biosintética, que asumir el gasto de ATP correspondiente al funcionamiento de dicha vía, cuando el producto está disponible en el medio.

## MECANISMOS DE VARIACIÓN GENOTÍPICA

Como vimos, las bacterias tienen mecanismos que les permiten cambiar su expresión génica, favoreciendo la síntesis de los productos de ciertos genes, y reprimiendo la de otros. Estos mecanismos pueden llamarse de variación fenotípica, ya que implican una serie de cambios en el fenotipo celular, o de la población bacteriana. También existen mecanismos de variación genotípica, que serán igualmente traducidos en cambios fenotípicos, pero que se basarán en una modificación de la información genética contenida en la célula.

Básicamente, existen dos formas de variación genotípica en las bacterias. Por un lado, en el genoma se producen cambios debidos a mutaciones, y por otro, las bacterias pueden intercambiar material genético y sufrir recombinación.

### Mutaciones

Una mutación es un cambio heredable en la secuencia de bases de los ácidos nucleicos, que constituyen el genoma de un organismo. La misma se produce en condiciones naturales con baja frecuencia, y se debe fundamentalmente a errores en los procesos de replicación del DNA. Además de las mutaciones espontáneas, pueden ocurrir mutaciones inducidas, provocadas por agentes mutagénicos (químicos, físicos o biológicos), que proporcionan una herramienta para introducir cambios en el genoma bacteriano en el laboratorio. La mayoría de estos errores o alteraciones introducidos en el genoma, son corregidos por los mecanismos de reparación del DNA, pero algunos

escapan a la corrección, y pueden originar cambios heredables que proporcionan una diversidad genética. Dada la baja frecuencia de mutaciones, solo los microorganismos con alta tasa de crecimiento pueden alcanzar cifras suficientemente altas, como para que sean detectables.

Las mutaciones en las bacterias, frecuentemente afectan propiedades fácilmente reconocibles como requerimientos nutricionales, morfología o resistencia antibiótica.

Algunas mutaciones pueden conferir al mutante una ventaja frente a la cepa que le dio origen, bajo ciertas condiciones ambientales, de manera que la progenie de dicha célula mutante, es capaz de superar el crecimiento de la cepa original y sustituirla. Este es el caso de las mutaciones que confieren resistencia a los antibióticos, en las que el mutante resistente se seleccionará en un ambiente, en el que las bacterias estén expuestas al antibiótico en cuestión. Este tipo de mutaciones se denominan selectivas. En cambio, frente a una mutación no selectiva, la bacteria no adquiere beneficios en relación a su progenitor, por ejemplo la pérdida de pigmento de las colonias de *Serratia marcescens*, que se observa cuando se cultivan en agar.

Las mutaciones puntuales, son aquellas que implican un cambio en una única base, y pueden provocar que se cambie un aminoácido por otro en el producto proteico (mutación por cambio de sentido). Otras veces no se traducen en ningún cambio (mutación silenciosa), dado que como sabemos existe más de un codón para cada aminoácido. También puede suceder que el codón se convierta en una señal de terminación (mutación sin sentido), y en ese caso se traducirá una proteína incompleta no funcional.

Las delecciones y las inserciones producen cambios más notorios en el DNA, provocando la pérdida o la incorporación de cualquier número de pares de bases. Por lo tanto, siempre que éste no sea múltiplo de tres se producirán mutaciones por desplazamiento del marco de lectura, que suele provocar la pérdida total del fenotipo.

Muchas mutaciones que originan un producto proteico defectuoso, pueden ser suprimidas por un segundo evento de mutación en otro sitio del genoma (mutaciones supresoras), restaurándose el fenotipo original.

### **Transferencia horizontal de genes entre bacterias**

La recombinación genética es el proceso mediante el cual, los elementos genéticos contenidos en el genoma de diferentes individuos se combinan. Esto permite que el individuo origine alguna nueva función, que pueda dar como resultado una adaptación a los cambios en el medio ambiente. Este es un evento evolutivo importante, y las células tienen mecanismos específicos que aseguran que dicha recombinación se efectúe. A diferencia de los eucariotas donde la recombinación genética ocurre en asociación a la reproducción sexual, en los procariotas comprende una serie de mecanismos independientes del evento de reproducción celular.

Los mecanismos clásicos de transferencia de material genético entre bacterias son llamados transformación, transducción y conjugación.

#### **TRANSFORMACIÓN**

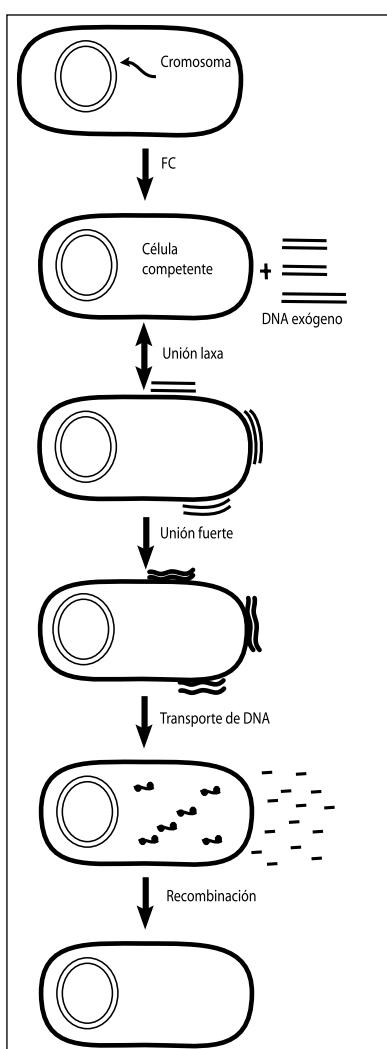
La transformación es el proceso por el cual ciertas bacterias llamadas competentes, son capaces de incorporar DNA exógeno proveniente de otras bacterias, que está libre en el medio.

La virulencia del *Streptococcus pneumoniae* está relacionada con la presencia de una

cápsula polisacáridica a su alrededor. Las bacterias con cápsula tienen un aspecto liso (S) cuando se cultivan en placas de agar, y son capaces de matar a los ratones que son inyectados experimentalmente con una suspensión bacteriana. Las colonias con bordes rugosos (R) de *Streptococcus pneumoniae*, carecen de cápsula y no son letales al infectar ratones.

Frederick Griffith en 1928 observó por primera vez la transformación, cuando mezcló bacterias S muertas con bacterias R vivas, y encontró que al inyectar la mezcla en ratones, también resultaba letal. De esto concluyó que las cepas R habían sido transformadas en bacterias S, ahora capaces de fabricar el polisacárido capsular virulento.

La capacidad de captar el DNA exógeno, conservarlo en forma estable e interactuar con él, se denomina competencia. Este fenómeno depende de la presencia de un sistema de captación de DNA específico asociado a la membrana (ver figura 4.7).



**Figura 4.7. Modelo para el proceso de transformación natural.** Para la inducción del estado competente se requiere de un factor de competencia (FC). El DNA exógeno bicatenario se une a las células competentes en dos pasos diferentes, la unión laxa y la fuerte. Fragmentos de DNA monocatenarios son transportados al interior celular unidos a proteínas. Estos complejos DNA-proteínas facilitan la recombinación posterior de los fragmentos exógenos en el cromosoma huésped.

Ejemplos de bacterias con competencia natural son *Haemophilus influenzae*, *Neisseria* spp., *Streptococcus pneumoniae*, y ciertas especies de *Bacillus*. Aunque la mayoría de las bacterias no presentan capacidad natural para captar DNA, es posible inducir en el laboratorio la competencia, generando por distintos medios distorsiones en la membrana celular; por ejemplo con pulsos eléctricos (electroporación), o con cambios osmóticos y térmicos. Estos procedimientos son muy usados para introducir experimentalmente DNA extraño, por ejemplo un plásmido en una bacteria, y así transformarla para que adquiera un fenotipo de interés. Las bacterias también pueden ser transformadas con DNA viral, en cuyo caso el proceso se llama transfección.

### TRANSDUCCIÓN

La transducción es la transferencia de DNA de una bacteria a otra por intermedio de un bacteriófago.

Existen dos formas de transducción, la especializada y la generalizada. La primera ocurre cuando un fago temperado porta genes bacterianos, adquiridos durante un ciclo infeccioso anterior, y al infectar una nueva bacteria e integrar su genoma al cromosoma bacteriano, incorporará a éste la información genética correspondiente a la bacteria infectada previamente. La transducción generalizada se produce por partículas virales defectuosas, que se originan como cápsides vacías durante la replicación viral, y que luego incorporan DNA de una bacteria. Así al infectar una nueva bacteria, podrá introducir en ella dicho material genético (ver figura 4.8 y 4.9).

### CONJUGACIÓN

La conjugación se basa en el intercambio unidireccional de información genética desde una bacteria donante, a otra receptora mediante un contacto real (ver figura 4.10).

Los plásmidos son los elementos genéticos que con mayor frecuencia se transmiten de esta forma.

La capacidad de conjugación depende de la presencia en la bacteria de plásmidos conjugativos, que contienen los genes necesarios para tal proceso. Un ejemplo muy conocido de plásmido conjugativo es el plásmido F de *E. coli*, que codifica las proteínas necesarias para la conjugación, incluyendo el pili sexual. El pili, es una estructura especializada esencial para el contacto entre la bacteria donadora y la receptora.

Generalmente, los plásmidos conjugativos solamente causan la transferencia de su propio material genético, pero en ocasiones el plásmido puede integrarse al cromosoma bacteriano, y en el momento de conjugar se transferirá no solo a sí mismo, sino también a los genes cromosómicos que se encuentran tras él. Teóricamente todo el cromosoma podría ser transferido, lo que requeriría más de dos horas, pero la unión entre las bacterias por medio del pili persiste menos tiempo.

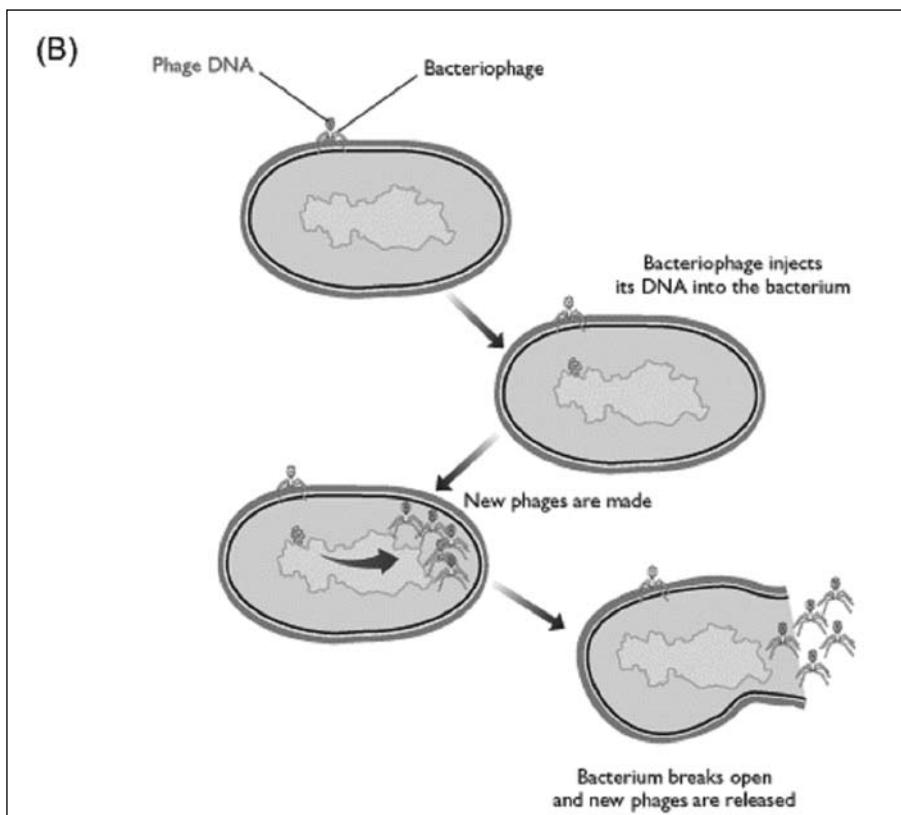
Las cepas bacterianas con el plásmido F tienen gran capacidad de recombinación, por lo que se denominan cepas hfr por su sigla en inglés *high frequency of recombination*.

Debemos recordar que este es un mecanismo muy efectivo para la transferencia de genes de resistencia antibiótica.

### Secuencias de inserción y transposones

Los elementos transponibles, son segmentos de DNA capaces de moverse desde una posición a otra en el genoma. Es decir, que pueden transponerse o “saltar” desde un sitio determinado del genoma, separándose del resto del DNA, hasta otro sitio distinto

**Figura 4.8. (B) Ciclo de infección lítica.** Luego de la inyección en *E. coli*, el genoma del fago T2 dirige la síntesis de nuevos fagos. Para T2 el ciclo dura 20min. a 37°C y finaliza con la lisis celular bacteriana y la liberación de 250–300 nuevos fagos.



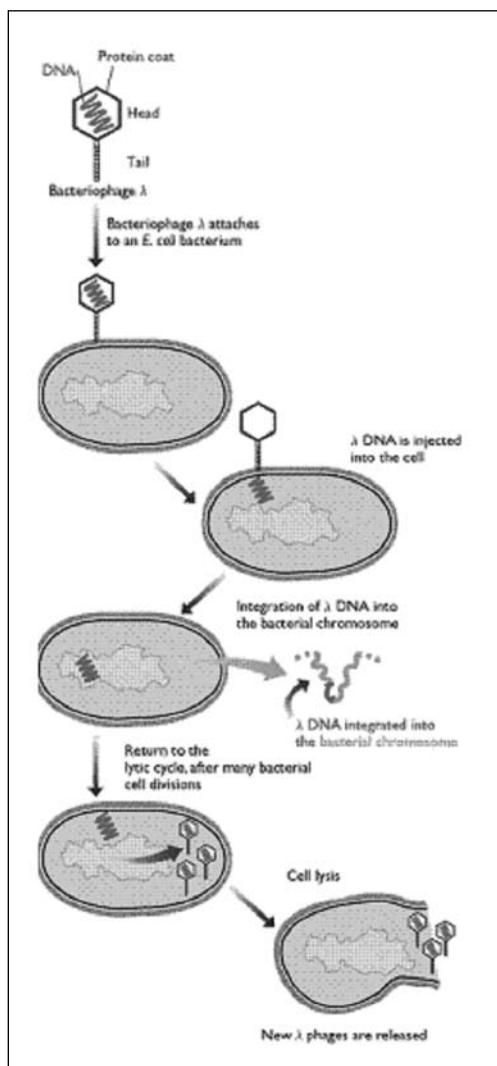
al cual se integran. También pueden transponerse desde el cromosoma a un plásmido o viceversa, o a distintos sitios dentro de la misma molécula de DNA.

Los elementos transponibles están ampliamente distribuidos en la naturaleza, tanto en virus, como en células procariotas y eucariotas. Existen dos tipos de elementos transponibles: las secuencias de inserción (elementos IS), y los transposones (Tn).

Los elementos IS son segmentos pequeños de DNA, de aproximadamente 1 a 2 Kb, que contienen la información genética mínimamente necesaria para la transposición. Poseen secuencias específicas en ambos extremos del fragmento, que consisten en repeticiones invertidas una respecto de la otra. Estas secuencias, son reconocidas específicamente por enzimas codificadas en el mismo elemento IS, denominadas transposasas, responsables de la integración del elemento al sitio blanco del genoma.

Los Tn son segmentos de DNA, que además de portar la información necesaria para la transposición, contienen genes que pueden codificar diferentes propiedades fenotípicas. Dentro de éstas se destaca la resistencia a ciertos antibióticos, como es el caso de la resistencia de alto nivel a la gentamicina, que tienen algunas cepas de *Enterococcus* spp. Algunos plásmidos poseen uno o más Tn, que portan determinantes de resistencia a antibióticos. La capacidad de estos elementos para transponerse de un plásmido a otro, proporciona a la bacteria gran flexibilidad para desarrollar

**Figura 4.9.** Ciclo de infección lisogénica del bacteriófago  $\lambda$ . La inserción del genoma del fago en el cromosoma bacteriano puede permanecer quiescente por muchas generaciones.



resistencia, dado que dichos plásmidos son generalmente conjugativos, por lo que pueden transferirse entre distintas bacterias.

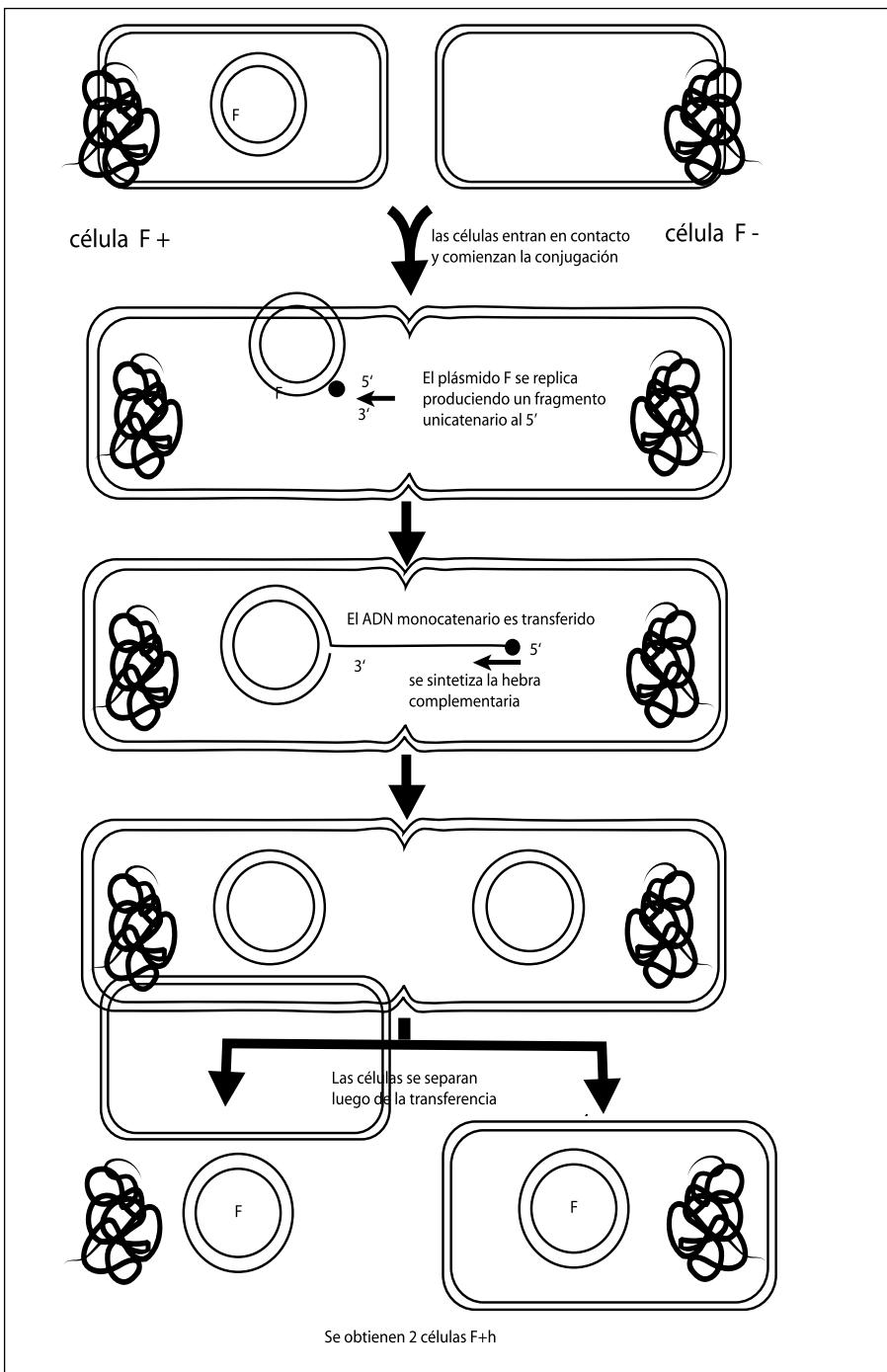
La inserción de un elemento transponible puede producir diferentes efectos sobre la expresión de la información génica, como impedir la funcionalidad de un gen o activar la expresión de otro.

### Integrónes y cassettes genéticos

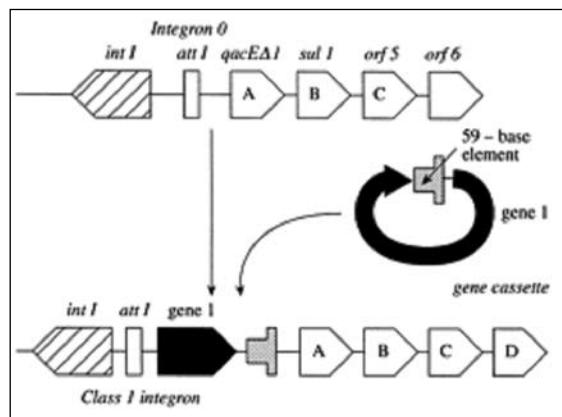
Un integrón se define como un elemento genético que posee un sitio llamado *attI*, en el cual se integra DNA adicional en forma de cassette genético, por medio de recombinación específica de sitio. También codifica una enzima denominada integrasa, que media dicha recombinación (ver figura 4.11).

El integrón básico llamado *In0*, de clase 1, carece de cassette genético integrado. Su característica estructural esencial es la presencia del gen de la integrasa (*intI*), el

**Figura 4.10.** Transferencia del plásmido F mediante conjugación. Una célula F+ es capaz de sintetizar un pili especial (factor F) que le permite iniciar el proceso de conjugación para transferir el plásmido F a una célula receptora F-.



**Figura 4.11.** Estructura de un integrón Clase 1.



sitio de inserción del casete *attI*, y el promotor ubicado dentro del gen *intI*, que se encarga de transcribir directamente hacia el sitio de integración, donde los *cassettes* son expresados.

Los *cassettes* genéticos son elementos génicos discretos, que pueden existir libremente de forma circular, como moléculas no replicativas, cuando se mueven de un sitio genético a otro. Sin embargo son encontrados como secuencias lineales que constituyen parte de una gran molécula de DNA, como los plásmidos o el cromosoma bacteriano. Contienen un único gen y secuencias adicionales, llamada elemento base 59, que funciona como el sitio de recombinación específico. El *cassette* normalmente es pequeño de 500 a 1000 pb, carecen de promotor, y los genes son expresados por el promotor del integrón.

Se distinguen diferentes clases de integrones. Los denominados de clase 1 son la mayoría de los encontrados en aislamiento clínicos, y son los originalmente llamados integrones, siendo los más intensamente estudiados. Los integrones de clase 2, incluyen un sistema encontrado en el transposón Tn7, y elementos relacionados. Los de clase 3, se encuentran menos frecuentemente y están menos estudiados.

Se han identificado más de 40 *cassettes* genéticos diferentes, y es razonable que se descubran muchos más. Existe un set de *cassettes* que confieren resistencia a muchos antibióticos como aminoglucósidos, betalactámicos, cloramfenicol, y trimetroprim, así como también a desinfectantes y antisépticos.

La mayoría de los integrones descritos hasta ahora están formados por genes de resistencia antibiótica. Sin embargo, se han encontrado genes determinantes de virulencia como por ejemplo el *cassette* VCRs (*Vibrio cholerae* repeated sequences) en el cromosoma de *Vibrio cholerae*. Éstos son una familia de 123 a 126 pb, de simetría imperfecta, pareja al cromosoma de *Vibrio cholerae* (hasta 60 copias).

Otro tipo de *cassettes* genéticos con un rol fundamental en el proceso infeccioso, son las islas de patogenicidad. Estas regiones de DNA encontradas tanto en el cromosoma como en plásmidos de bacterias patógenas, se componen de un grupo de genes típicamente de 15 a 25 y a veces más, que se han adquirido por transferencia horizontal.

Es común la presencia de secuencias con un rol en la movilidad del DNA, dentro o flanqueando las islas de patogenicidad. Sin embargo se ha demostrado que algunos

de estos grupos genéticos son móviles, como la isla de patogenicidad que codifica el gen para la toxina de shock tóxico de *Staphylococcus aureus*. La estabilización de la isla de patogenicidad en la bacteria, requiere probablemente la inactivación de las funciones relacionadas con la movilidad.

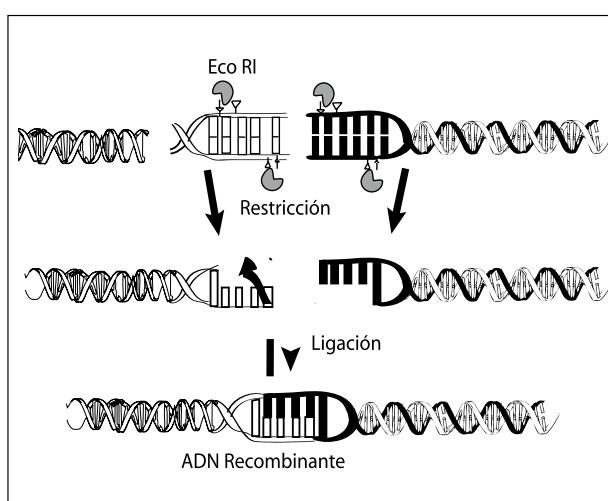
## APORTES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR Y LA GENÉTICA BACTERIANA A LA MEDICINA

Una de las contribuciones más importantes de la ingeniería genética de bacterias, es su uso para desarrollar vectores o vehículos que permitan el clonado de cualquier secuencia de DNA. Los vectores más usados con este fin son los plásmidos bacterianos.

Clonar implica introducir un fragmento de DNA en un vector. Los vectores de clonación deben permitir la inserción de un fragmento de DNA extraño, y ser capaces de replicarse normalmente dentro de la bacteria. Como vimos, los plásmidos tienen la capacidad de autorreplicarse, y son elementos génicos factibles de ser transferidos entre bacterias, e introducidos en una cepa deseada; por lo tanto constituyen buenos vectores de clonación.

Actualmente existen varios tipos de vectores, algunos plasmídicos como el pBR322 o el pUC, y también virales como el bacteriófago lambda, o los más modernos llamados cósmidos, que combinan algunas de las ventajas de los plásmidos con las de los fagos.

Para clonar un gen cualquiera en un plásmido, es necesario primero cortar el DNA plasmídico, y el DNA del cual procede el gen a clonar, para luego ligarlos de la forma deseada. Para esto, se utilizan enzimas de restricción. Muchas bacterias sintetizan estas enzimas, que son capaces de cortar hebras de DNA extraño a la propia bacteria, en secuencias nucleotídicas específicas. Por ejemplo, una cepa determinada de *Escherichia coli*, produce una enzima denominada EcoRI, que reconoce la secuencia GAATTTC y la corta (ver figura 4.12). Después que EcoRI ha cortado el DNA, quedarán bases sin aparear que estarán disponibles para aparearse con otro fragmento de DNA, que tenga las bases complementarias. Si cortamos dos fragmentos de DNA con esta enzima, y



**Figura 4.12.** Mecanismo de acción de la endonucleasa EcoRI. La enzima EcoRI reconoce la secuencia GAATTTC en el DNA de doble cadena. En ese sitio es capaz de cortar el DNA dejando extremos cohesivos. Esto permite restringir dos moléculas de DNA diferentes y luego ligarlas (utilizando una enzima ligasa), para producir una molécula de DNA recombinante.

mezclamos los productos de esa reacción, se obtendrá un producto recombinante por combinación de los dos DNA originales.

Estas enzimas que han sido purificadas hace tiempo, y que hoy se producen comercialmente, son usadas para clonar genes por ejemplo en un plásmido bacteriano. De esta manera, es posible incorporar en un plásmido bacteriano un gen eucariota, que codifique para una proteína determinada que nos interese producir en grandes cantidades, siempre que se conozca su secuencia nucleotídica, y se disponga de enzimas de restricción que sean capaces de cortar específicamente el fragmento que contiene el gen. Una vez obtenido el fragmento de DNA de interés, y cortado el plásmido que será usado como vector con las mismas enzimas de restricción, estaremos en condiciones de ligar ambos fragmentos de DNA, valiéndonos de las propiedades de complementariedad de bases del DNA; así se construye el plásmido recombinante. Este plásmido podrá ser introducido por transformación en una cepa bacteriana apropiada, y se podrá producir la proteína de interés en un cultivo bacteriano de *Escherichia coli*, purificándola luego a partir del cultivo (ver figura 4.13).

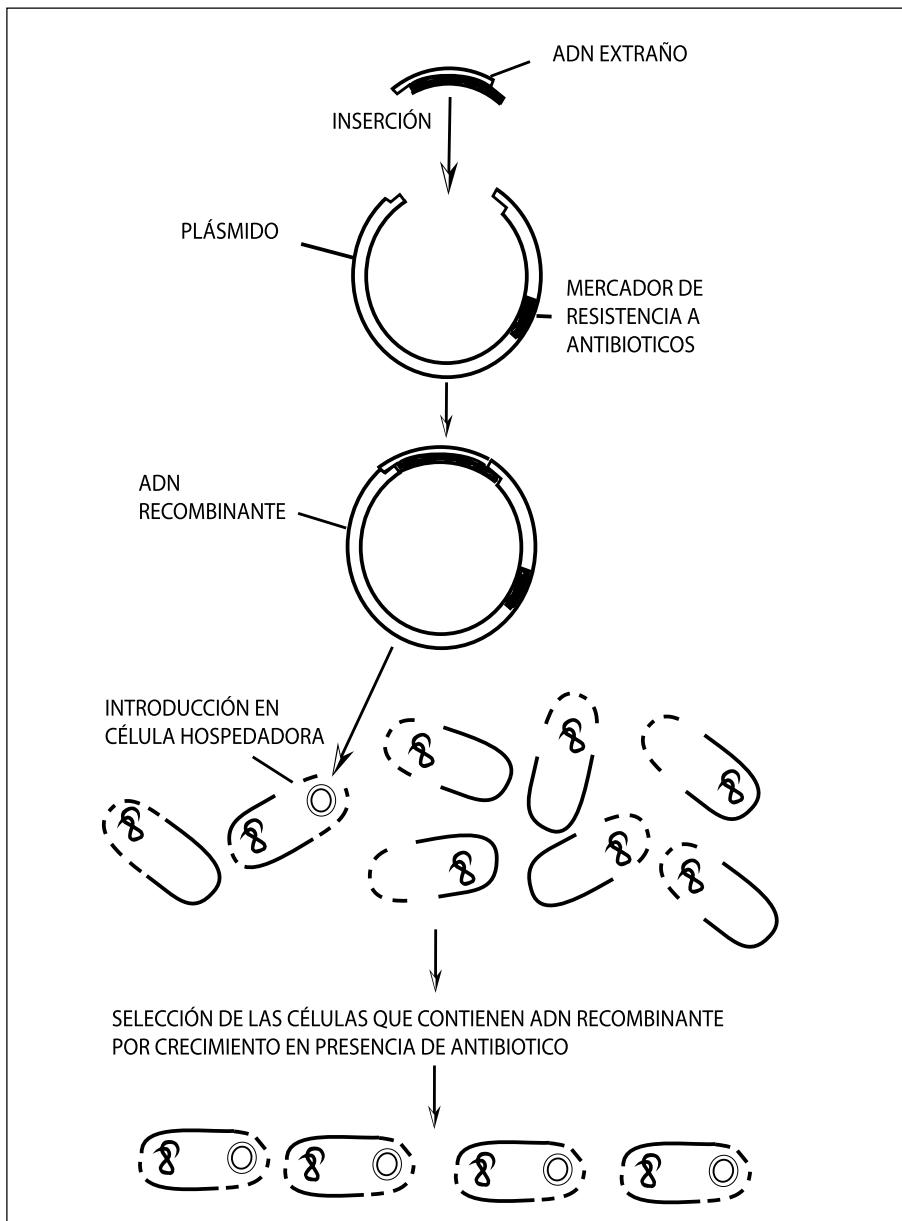
Usando estos procedimientos de clonado y expresión de genes, actualmente se producen muchas proteínas que son usadas en el tratamiento de algunas enfermedades humanas (por ejemplo la diabetes). Se producen hormonas humanas como la insulina, la hormona de crecimiento o el interferón, en bacterias recombinantes obteniendo cantidades suficientes como para su aislamiento y uso terapéutico.

Además, la disponibilidad de antibióticos naturales para el tratamiento de las infecciones bacterianas no es infinita, por lo que otra importante área de investigación, se centra en la aplicación de la ingeniería genética a la creación de nuevos antibióticos. Por manipulación genética se intenta producir mutaciones específicas, en los genes encargados de la codificación de proteínas con efecto antibiótico, o producir moléculas de antibióticos híbridos, logrados por técnicas de DNA recombinante.

Otra importante aplicación de la biología molecular a la medicina, es la producción de vacunas recombinantes. Este procedimiento se basa en la expresión en bacterias, de genes propios de patógenos contra los que se desea vacunar, por ejemplo virus, parásitos, o bacterias. El procedimiento consiste básicamente en el clonado de genes que codifican para antígenos de superficie del virus, o del parásito contra el que se desea vacunar. Estos antígenos serán expresados en la cepa recombinante, y purificados a partir del cultivo de la misma cepa, usándose luego como inmunógenos. Así, clonando los genes apropiados en los microorganismos adecuados, podrán producirse grandes cantidades del antígeno puro. Este método proporciona la ventaja de que evita trabajar con microorganismos patógenos. El desarrollo de la vacuna contra la hepatitis B, representa el primer éxito de las vacunas recombinantes. Ésta, es producida en una levadura que ha sido transformada previamente con un vector recombinante, que contiene el gen del antígeno de superficie del virus.

Estos métodos pueden usarse también para la producción de vacunas vivas, es decir vacunas que son administradas con virus o bacterias vivas, que han sido manipuladas genéticamente para perder su virulencia, pero que mantienen intactas sus propiedades inmunogénicas. Además, estos microorganismos denominados atenuados, pueden usarse como vectores de genes de otros gérmenes patógenos, para producir vacunas que inmunicen contra más de una enfermedad infecciosa a la vez. Estos procedimientos son motivo de investigación en los laboratorios de desarrollo de vacunas en todo el mundo.

**Figura 4.13.** Clonación de un fragmento de DNA en un plásmido. Un gen de interés puede ser clonado en un plásmido. Para eso, el DNA plasmídico y el DNA exógeno son tratados con la misma enzima de restricción y mezclados en presencia de una enzima ligasa. El producto de la ligación es introducido en una cepa bacteriana por transformación, y se seleccionan los clones recombinantes por la resistencia al antibiótico portada por el plásmido.



## BIOTECNOLOGÍA APLICADA AL DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Otro uso de la producción de antígenos a escala industrial en bacterias, es para realizar pruebas diagnósticas que detecten anticuerpos específicos contra antígenos micro-

bianos, en el suero de pacientes. En estos casos, interesa clonar en una bacteria de rápido crecimiento como *E. coli*, el gen que codifica para un antígeno determinado del microorganismo, contra el cual se desea detectar la respuesta inmune desarrollada por el paciente. De esta manera, se producirá el antígeno proteico en cantidad suficiente como para “capturar” los anticuerpos en la técnica elegida para la prueba diagnóstica, ya sea por enzimoinmunoensayo, inmunofluorescencia, aglutinación de partículas de látex u otras. Un ejemplo de esto, es el reciente desarrollo de una técnica inmunoenzimática, para la detección de anticuerpos dirigidos contra el antígeno del core del virus de hepatitis B, habiéndose este antígeno clonado y expresado en *E. coli*.

Las bacterias patógenas se comportan como tales porque poseen ciertos genes, tanto en cromosomas como en plásmidos, que le confieren la capacidad de expresar determinadas características fenotípicas, denominadas factores de virulencia o determinantes de patogenicidad.

El estudio detallado de la genética bacteriana, ha permitido identificar algunos de estos genes, y hoy somos capaces no solo de identificar a una bacteria como patógena cuando la aislamos produciendo enfermedad, sino también cuando encontramos en ella los genes responsables de la expresión de determinantes de patogenicidad.

Esto es importante cuando no alcanza con identificar a nivel de especie, una cepa bacteriana aislada de una muestra biológica patológica, para afirmar que esa bacteria es el agente causal del proceso infeccioso. Este es el caso de las enfermedades diarreicas causadas por ciertas cepas de *E. coli*. Como sabemos, *E. coli* es parte de la microflora normal del aparato intestinal del hombre, y por supuesto esas bacterias no actúan como patógenos en el intestino. Sin embargo, algunas cepas especiales de la misma especie, cuando colonizan el aparato gastrointestinal, a través de la ingesta de alimentos o agua contaminados, son capaces de multiplicarse y causar un proceso infeccioso que se manifiesta con diarrea. Estas cepas productoras de diarrea, difieren en su carga genética de las pertenecientes a la flora normal, en que poseen genes que codifican para factores de virulencia. Por ejemplo pueden ser capaces de producir toxinas, cuyo blanco de acción es el enterocito, o producir determinadas proteínas de membrana externa para adherirse a la mucosa intestinal.

Entonces, cuando en una enfermedad diarreica hay que establecer el diagnóstico clínico microbiológico, por ejemplo en un lactante (edad en la que *E. coli* es el primer agente causal de diarrea), no alcanzará con identificar fenotípicamente como *E. coli* a una cepa aislada en el coprocultivo, sino que habrá que determinar la presencia de ciertos determinantes de patogenicidad, para afirmar que se trata de una cepa patógena. Una opción para esto es identificar la presencia de los genes que codifican para estos determinantes. Para esto se han desarrollado técnicas de hibridación por sondas, que se basan en las propiedades de complementariedad de bases del DNA. Una sonda, es un fragmento de DNA complementario a una región de un gen que nos interesa identificar, la cual ha sido previamente marcada con algún indicador, que pueda ser detectado luego de la hibridación. El marcado puede realizarse incorporando nucleótidos radioactivos o biotinilados, o marcados con digoxigenina.

Si en un cultivo bacteriano interesa saber si posee el gen X, cuya secuencia es conocida, podremos construir una sonda específica para dicho gen, extraer el DNA del cultivo, y mezclarlo con nuestra sonda. Esto se realiza en condiciones que puedan desnaturalizar la estructura de doble cadena de DNA, para permitir que la sonda logre hibridar con su secuencia complementaria. Así, podremos evidenciar si nuestro

cultivo posee o no el gen buscado, porque de estar presente, encontraremos la marca correspondiente a la sonda incorporada en la estructura del DNA. Esta técnica puede usarse aplicando la sonda directamente sobre una muestra clínica, por ejemplo una sección tisular, y en ese caso se denomina hibridación *in situ*.

Hoy se disponen de muchas sondas específicas de DNA usadas para el diagnóstico de muchas enfermedades bacterianas. La hibridación por sondas y otros métodos para detectar un gen en particular, es útil para realizar el diagnóstico etiológico de las infecciones producidas por microorganismos cuyo cultivo es difícil; ya sea por crecimiento lento como en *Mycobacterium* spp., o por tener requerimientos especiales de cultivo y aislamiento como *Chlamydias* spp., *Rickettsias* spp. o virus.

El mayor problema diagnóstico usando hibridación por sondas, es la baja sensibilidad de la técnica, dado que es necesario que en la muestra existan suficientes copias del gen buscado, como para que la marca correspondiente a la sonda sea detectada. Generalmente, las técnicas de hibridación *in situ* con sondas no radioactivas, son capaces de detectar más de 200 copias del gen. Por esto, muchas veces la sensibilidad de la técnica no es suficiente, como para descartar aquellas muestras en las que se obtienen resultados negativos.

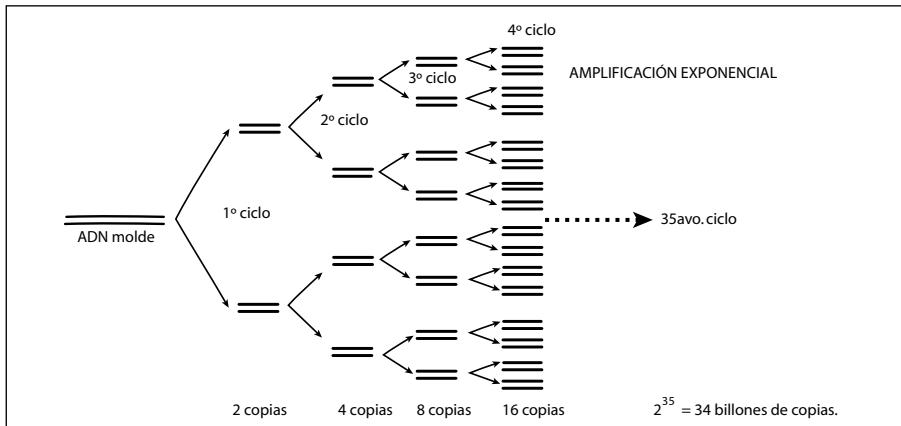
Uno de los más interesantes avances en diagnóstico clínico, ha sido el desarrollo de un método que permite amplificar el número de copias de un determinado fragmento de DNA de interés. Esta técnica, llamada reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), permite generar millones de copias exactas de un fragmento de DNA, a partir de una copia original en dos o tres horas. La PCR se basa en las propiedades de replicación del DNA, la cual puede reproducirse *in vitro* si se coloca el DNA molde en una mezcla de DNA polimerasa, nucleótidos y cebadores específicos (*primers*), para las regiones del fragmento que se desea amplificar. Esta mezcla, se coloca en condiciones de pH y osmolaridad, tales que permitan el funcionamiento adecuado de la polimerasa. Primero se coloca la mezcla a altas temperaturas (94 o 95°C) para lograr que el DNA se desnaturalice, es decir que se separen ambas hebras. Luego se somete a temperaturas adecuadas para que los cebadores hibriden con el DNA molde (entre 40 y 55°C, según la secuencia de los cebadores). En una tercera etapa, se coloca a la temperatura adecuada para que la polimerasa de DNA actúe catalizando la replicación. Las polimerasas que se usan para estos fines, deben ser capaces de tolerar las altas temperaturas de desnaturalización del DNA, por lo que la enzima utilizada proviene de una bacteria termófila. La polimerasa más usada en PCR, proviene de *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa), cuya temperatura óptima es 72°C. Hoy se usa ésta y también otras enzimas, producidas en forma recombinante en *E. coli*.

Estos cambios de temperatura se realizan en un termociclador, que es capaz de variar entre rangos muy amplios de temperatura, en tiempos muy cortos. Este ciclado de temperaturas, por ejemplo 94°C por un minuto, 45°C por un minuto, y 72°C por un minuto y medio, se repite aproximadamente 30 veces. Así, se logra que en cada ciclo se duplique el número de copias de cada una de las hebras del DNA molde, con lo que se logra un crecimiento exponencial (figura 4.14).

Este procedimiento puede aplicarse directamente a una muestra clínica, para determinar la presencia o ausencia de un microorganismo en particular, mediante la detección de una secuencia específica en su ácido nucleico.

Para revelar el resultado del ensayo, la mezcla de reacción debe ser sometida a

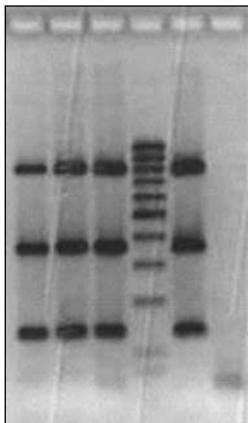
**Figura 4.14.** Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El DNA molde se desnaturaliza (aprox. 94°) y los primers se unen en sus secuencias complementarias en los extremos de la región a amplificar (aprox. 55°, según la secuencia de los primers). Luego la polimerasa sintetiza una nueva hebra de DNA a partir de cada primer copiando la cadena molde (a 72°). Así se completa un ciclo, repitiéndose el proceso unas 35 veces, amplificando la secuencia de interés en forma exponencial.



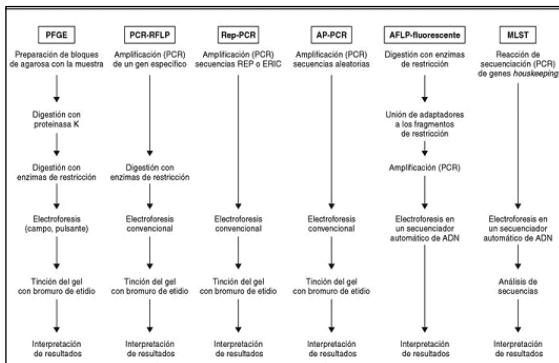
electroforesis en gel de agarosa, o de poliacrilamida. En la electroforesis, el DNA migra desde el polo negativo al positivo en diferentes grados según el peso molecular, es decir según su tamaño en pares de bases. El fragmento a amplificar es por supuesto de tamaño conocido, por lo que podrá determinarse la presencia del gen buscado en la muestra, porque se habrá amplificado en la reacción y aparecerá una banda del tamaño correspondiente en el gel. Por ejemplo, para confirmar si una *E. coli* pertenece al tipo patogénico (patotípico) STEC (*E. coli* productor de toxina de Shiga), agente de diarrea con sangre, se realiza la búsqueda de los genes de las toxinas Stx1 y Stx2, por PCR para su confirmación. Además, por medio de la PCR múltiple, se pueden determinar otros genes de virulencia como el gen *eae*, que codifica para una proteína de unión íntima al enterocito llamada intimina (ver figura 4.15).

Los geles deberán ser revelados para que desarrollen una reacción de color visible, que nos ayude a determinar la presencia o ausencia de la banda de interés. En los geles de agarosa, el revelado se hace generalmente con bromuro de etidio, que es un agente intercalante del DNA, es decir, que su molécula se intercala entre las bases del ácido nucleico. Este procedimiento colorea el gel, porque el bromuro de etidio es fluorescente bajo luz ultravioleta; por lo tanto cuando el gel se expone a la misma, se evidenciará o no la banda correspondiente. En los geles de poliacrilamida, el revelado puede realizarse con nitrato de plata.

El resultado de la PCR también puede evidenciarse, combinando la PCR con una técnica de hibridación por sondas. Esto se logra transfiriendo el DNA del gel a una membrana (por ejemplo de nitrocelulosa), y ponerla en contacto con una sonda específica. En este caso el revelado lo brinda la marca de la sonda. Este procedimiento de transferencia de DNA a una membrana combinado con hibridación por sondas, se denomina Southern blot. Las técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR, se fundamentan en el mismo principio general común a todas ellas: la amplificación de genes o secuencias de DNA polimórficas, y la separación electroforética de los productos de amplificación. Las técnicas de PCR



**Figura 4.15.** PCR mixta de los genes *stx1*, *stx2* y *eae* de cepas STEC. Carriles 1, 2 y 3 cepas problemas positivas par los 3 genes, carril 4: marcador de peso molecular de 100 pb, carril 5: control positivo y carril 6: control negativo.



**Figura 4.16.** Representación esquemática de los pasos más importantes de varias técnicas de tipificación mediante PCR

se pueden utilizar conjuntamente con otros métodos moleculares, como la restricción enzimática, la hibridación con sondas específicas, o la secuenciación de ácidos nucleicos (ver figura 4.16).

En suma, actualmente se dispone de algunas técnicas de tipificación basadas en la PCR, que pueden utilizarse como método preliminar para el estudio de la relación clonal entre microorganismos de una misma especie. La elección de la técnica más adecuada depende de muchos factores. Entre ellos existen factores de tipo técnico, como ser una técnica rápida, poco laboriosa, fácil de interpretar, y con un elevado poder de discriminación y reproducibilidad; y factores de tipo económico como el bajo costo.

Aunque hemos centrado el interés de estas técnicas de detección de ácidos nucleicos para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, también son usadas para diagnosticar algunas enfermedades neoplásicas y hereditarias.

La aplicación de la biotecnología molecular a la medicina, representa un campo de intensa investigación y vertiginoso desarrollo. La prevención, el tratamiento, y el diagnóstico de muchas enfermedades que hasta hace pocos años resultaba imposible, hoy son una realidad, y cada vez más la biología molecular aporta conocimientos y tecnología aplicables, a la mejora de la calidad de vida y la salud humana.

## BIBLIOGRAFÍA

- Lewin B. Genes VII. Ed. Reverté. 7<sup>th</sup> ed. 2000.
- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH, editors. Manual of Clinical Microbiology. 8<sup>th</sup>. ed. Washington, D.C: ASM Press; 2003.
- Peter M. Bennett. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.1999; 43: 1-4
- Brown. Genomes 2. Chapter 2.3. The Anatomy of the Prokaryotic Genome.T.A. 2th edition. 2002. Garland Science <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=genomes.section.5517>
- Fernández-Cuenca F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2004; 22: 355-60.

# 5 Métodos de estudio de bacterias y virus. Métodos diagnósticos

*D. Ruchansky, G. Algorta, D. Sandín*

## **INTRODUCCIÓN**

Uno de los propósitos de la microbiología médica es trabajar en asociación con la clínica, para brindar un diagnóstico, un manejo adecuado de las enfermedades infecciosas, y prevenir la diseminación de la infección a otros individuos.

Generalmente es importante documentar la presencia de la infección, determinar su naturaleza específica, y orientar la terapéutica adecuada en forma temprana en el curso de la enfermedad.

La buena calidad de este trabajo lleva implícita, entre otras, actividades propias del laboratorio como ser criterio de selección de exámenes a solicitar por los médicos clínicos; recolección, rotulado y transporte de las muestras; evaluación de las muestras y pruebas de laboratorio; procedimientos que verifican los resultados; y el uso apropiado de los resultados, para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades infecciosas.

Existen muchos métodos para realizar el diagnóstico de las infecciones microbianas en el laboratorio. Estas incluyen examen directo, aislamiento por cultivo, detección de antígenos y ácidos nucleicos, y pruebas serológicas para detectar la respuesta de anticuerpos del individuo a la infección.

No existe un único abordaje que cumpla todos los requerimientos del diagnóstico microbiológico; por lo tanto hay que implementar una combinación de métodos. La elección de los mismos dependerá de los diferentes factores, que incluyen el conocimiento de la patogénesis de los agentes sospechosos, el estado de la enfermedad, y la disponibilidad, así como la utilidad de los diferentes métodos para diagnosticar la infección particular.

## **ESTRATEGIA EN LA ELECCIÓN DE LOS MÉTODOS**

El laboratorio de microbiología deberá tener a disposición del clínico, todas las pruebas necesarias para el diagnóstico y la atención de los pacientes a servir. Pero no todas las pruebas pueden ser realizadas en el laboratorio, por lo tanto éste deberá decidir

cuáles se realizarán allí, cuáles se enviarán a un laboratorio de referencia, y cuál será ese laboratorio.

Las necesidades de los pacientes dictarán el número y la variedad de métodos que el laboratorio ofrecerá.

Basado en estudios numéricos, históricos y predictivos de las pruebas solicitadas, el laboratorio puede discontinuar pruebas poco usadas que resultan costosas, y de baja calidad. Por otra parte, antes de decidir implementar una nueva prueba diagnóstica, ésta deberá ser seleccionada previamente. El conocimiento de la población influirá en esta decisión, porque una prueba varía según su eficiencia para detectar un resultado positivo, en relación con la prevalencia de esa enfermedad en la población.

Generalmente las medidas de *performance* de una prueba incluyen sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo. Inherente a la determinación de la sensibilidad y la especificidad de una prueba, el *gold standard* o patrón de oro, es el parámetro con el que se compara la prueba; sin embargo esto no siempre es posible de realizar. Existen por ejemplo, pruebas de detección de antígenos y de RNA viral como los ensayos para virus sincicial respiratorio, que pueden ser más sensibles e igual de específicos que el cultivo convencional. En tales circunstancias no debe juzgarse la *performance* de una prueba contra métodos *standard*.

Cuando se dan las condiciones para una comparación con un método *gold standard*, la sensibilidad y la especificidad del método, son independientes de la población de pacientes a analizar. Así, los laboratorios no necesitan realizar grandes estudios de evaluación de nuevas pruebas, y usarán evaluaciones que fueron realizadas por microbiólogos competentes y respetados, que han sido publicadas en la literatura científica. La elección de una prueba deberá basarse en la *performance* publicada, y la utilidad detectada por el laboratorio, según la prevalencia percibida desde el laboratorio de la enfermedad en cuestión.

Es conveniente definir en este momento los conceptos de sensibilidad y especificidad. La sensibilidad de una prueba diagnóstica puede tener diferentes definiciones. Puede explicar la habilidad de una prueba para detectar pequeñas cantidades de lo analizado (por ejemplo los anticuerpos). Otra definición de sensibilidad determina que es la habilidad de un método para detectar casos positivos (ausencia de falsos negativos). También puede ser definida como la probabilidad de que una prueba sea positiva cuando la enfermedad está presente, o la proporción de personas con infección, que reaccionan positivamente en la prueba diagnóstica realizada. Por ejemplo, una prueba diagnóstica será más sensible, cuando detecte mayor número de personas infectadas o enfermas. La sensibilidad de una prueba se calcula según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Reactivos positivos} \times 100}{\text{Reactivos positivos} + \text{falsos negativos}}$$

La especificidad de una prueba es la habilidad que tiene para identificar correctamente a todos los negativos (ausencia de falsos positivos). Otra definición es la probabilidad de que una prueba sea negativa cuando la enfermedad no está presente, o la proporción de personas sin la infección o enfermedad, que reaccionan como negativas. Por ejemplo, una prueba es más específica cuando tiene menos reacciones positivas entre las muestras de personas que no tienen la enfermedad. La especificidad se calcula según la siguiente fórmula:

**No Reactivos x 100**

No Reactivos + Falsos positivos

Por otro lado, la eficacia de una prueba es la habilidad general de detectar correctamente todos los positivos y los negativos. Es una combinación de sensibilidad y especificidad y brinda una idea de la eficacia total de una prueba.

Hay que considerar que no es lo mismo aplicar una prueba a una población con alta prevalencia de determinada enfermedad, que a otra población con una baja prevalencia de la misma. Es interesante conocer los valores predictivos de estas pruebas. El valor predictivo, es la probabilidad de tener la enfermedad determinada por el resultado de la prueba. Existen dos tipos de valor predictivo, el positivo y el negativo.

El valor predictivo positivo, es la probabilidad de tener la enfermedad si el resultado de la prueba es positivo, y se calcula con la siguiente fórmula:

**Reactivos positivos x 100**

Reactivos positivos + falsos positivos

El valor predictivo negativo, es la probabilidad de no tener la enfermedad si el resultado de la prueba es negativo, y se calcula con la siguiente fórmula:

**No Reactivos x 100**

No Reactivos + falsos negativos

Los valores predictivos de las pruebas lo determinan la sensibilidad, la especificidad, y la prevalencia de la enfermedad en la población en la que se aplica dicha prueba.

## **RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS**

La investigación en laboratorio de los agentes etiológicos, estará orientada por los datos clínicos y epidemiológicos.

Se deben tener en cuenta una serie de normas generales para la recolección de la muestra a analizar.

### **Elección de la muestra clínica**

Es imprescindible seleccionar una muestra biológica adecuada al diagnóstico presuntivo de la infección, y un material que sea representativo para su análisis. La selección es crítica para el éxito de la detección del agente infeccioso. Se buscará el microorganismo en el sitio donde esté, y la toma estará exenta de contaminación externa; para esto es necesario que el técnico brinde al paciente las instrucciones al respecto.

Por ejemplo si el paciente tiene una neumonía, es incorrecto realizar un exudado faríngeo para aislar el germen causal, ya que las muestras respiratorias altas no son representativas de infecciones del aparato respiratorio inferior. Los microorganismos que causan estas infecciones son habitantes normales de la flora nasofaríngea. En esta enfermedad, el microorganismo también se puede aislar en la sangre del individuo, porque son enfermedades que pueden cursar con bacteriemia; también en el líquido pleural si está presente. Tampoco es correcto en enfermos con otitis media, buscar el microorganismo causal en el exudado nasal por las mismas razones. En el caso de

la otitis media, el microorganismo se puede aislar en el líquido del oído medio por punción de la membrana timpánica. Los materiales provenientes de sitios normalmente estériles, siempre son muestras excelentes cuando se realizan en condiciones adecuadas.

### **Oportunidad para la toma de la muestra**

Es necesario conocer la fisiopatología del proceso infeccioso que se presume, así como determinar en qué estadio del mismo se encuentra el paciente, ya sea en período de incubación, período de enfermedad, convalecencia, etc.

Por ejemplo, en un proceso viral agudo las mejores muestras generalmente son las que se obtienen al inicio de la enfermedad, dentro de las primeras 72 horas, cuando la concentración de nuevas partículas virales es elevada. Después de transcurridos siete días, habitualmente no vale la pena realizar cultivos virales cuando se trata de huéspedes inmunocompetentes. No obstante, en huéspedes inmunodeprimidos y en infecciones virales persistentes o crónicas, el virus puede aislarse durante períodos prolongados.

En principio la recolección debe realizarse antes del inicio de la antibioticoterapia. Un ejemplo demostrativo es la realización de la punción lumbar en la meningitis aguda supurada, donde luego del diagnóstico clínico se realiza la punción lumbar para el estudio citoquímico y bacteriológico; antes de obtener los resultados, se inicia el tratamiento antibiótico. Posteriormente, cuando se tienen los resultados, en las mejores de las situaciones se podrá adecuar la terapéutica o adoptar otras conductas pertinentes.

Como los antibióticos no tienen efectos sobre los virus, se puede obtener una muestra para cultivo viral aún cuando el tratamiento antibacteriano ya se hubiera iniciado. También es útil conocer si el paciente ha recibido vacunas virales o tratamiento antiviral recientemente.

Para aislar *Salmonella typhi* en la fiebre tifoidea, se podrá aislar en una muestra de sangre obtenida en los primeros días de enfermedad. Con el pasar del tiempo, la posibilidad de recuperación del germe en la sangre disminuye, y habrá que recurrir a otras muestras como materia fecal, aunque es de menor significación clínica.

**El momento en que se recolecte la muestra dependerá si se quiere estudiar al agente o la respuesta inmune al mismo.**

### **Consideraciones para la toma de muestras.**

Las muestras deben ser obtenidas con materiales estériles según las normas de bioseguridad.

Siempre hay que preparar el sitio de extracción de la muestra. Si se realiza por punción, habrá que realizar la desinfección correcta de la piel; si es un examen de orina, la limpieza de la región y recolección de la mitad de la micción, etc.

Es importante destacar que es frecuente recibir en el laboratorio de microbiología muestras inadecuadas por diferentes razones.

A continuación describiremos algunas de las solicitudes inadecuadas que recibimos en el laboratorio. Por un lado tenemos los hemocultivos que se reciben como muestras únicas, o más de tres en 24 horas. Las muestras únicas de sangre dificultan la interpretación en el laboratorio, porque se aíslan microorganismos de la flora normal de piel, y no se puede evaluar si éstos son por contaminación de la muestra en el

momento de la extracción, o porque dicha bacteria es la causante de la enfermedad del paciente.

Para la mayoría de las muestras no se necesita realizar tomas seriadas, que recargan innecesariamente el trabajo del laboratorio, y no aportan datos nuevos de interés.

Las muestras de heridas o secreciones respiratorias para estudio bacteriológico, pueden ser inadecuadas cuando existe predominio de células epiteliales sobre la otra población celular, y no son representativas del estudio que se pretende.

En contraposición, para el estudio de virus respiratorios, se considera que la muestra fue incorrecta si en los aspirados nasofaríngeos no se obtuvieron células.

Otras muestras inadecuadas para estudio son muestras de objetos y superficies inanimadas, exudados de lesiones de boca, contenido intestinal, abscesos perirectales, colostomía, exudados de lesiones de decubito, y puntas de sondas vesiculares o catéteres pleurales.

La muestra deberá tener un volumen suficiente para su procesamiento, además de ser recogida en recipientes estériles y herméticos. Todas las muestras deben estar perfectamente rotuladas con la fecha de toma del material, e identificación del paciente. Es imperativo que la muestra se acompañe de datos clínicos, procedencia y el nombre del estudio solicitado. El envío debe realizarse rápidamente preservando la muestra de temperaturas extremas, y de la desecación. Para ello se usan medios de transporte apropiados para el mantenimiento tanto de virus, como de bacterias. Los hisopos son de diferentes materiales: algodón, alginato, etc. Debido a que existe la posibilidad de que algunos sean tóxicos para algunas especies bacterianas, se desaconseja su uso en algunas muestras. Generalmente los hisopos de algodón son de uso generalizado, considerando que pueden contener ácidos grasos no saturados inhibidores de *Neisseria gonorrhoeae*, por lo que se recomiendan los de alginato de calcio o de dacron para muestras uretrales.

A continuación detallaremos algunos ejemplos de recolección y transporte de muestras clínicas.

- **Hisopados conjuntivales.** Frotar la conjuntiva palpebral con un hisopo estéril humedecido con solución salina estéril. Colocar el hisopo en 3 o 4 ml de medio de transporte.
- **Hisopados de lesiones y vesículas cutáneas.** Recolectar la muestra dentro de los tres días de la aparición de la vesícula. Primero se lava suavemente con etanol al 70% la superficie de la vesícula o la lesión, luego se aspira el fluido vesicular con una jeringa de tuberculina, y se coloca el aspirado en 3 o 4 ml de medio de transporte. En las lesiones cutáneas o vesículas abiertas, frotar con un hisopo y colocarlo en 3 o 4 ml de medio de transporte.
- **Aspirado nasofaríngeo.** Es la muestra de elección para los virus respiratorios. Se introduce una sonda nasogástrica (SNG) por las fosas nasales hasta la rinofaringe, y se aspira el moco en un tubo colector especial. El contenido de la SNG se lava con medio de transporte para virus, que se recoge en el tubo colector.
- **Hisopados faríngeos.** Frotar las amígdalas y la faringe con un hisopo de algodón seco. Colocarlo en 3 o 4 ml de medio de transporte.
- **Hisopados rectales.** Introducir un hisopo de algodón humedecido, 2 o 3 cm dentro del canal anal, y realizar movimientos rotatorios. Colocar el hisopo en 3 o 4 ml de medio de transporte.
- **Heces.** Recolectar 2 o 4 g de la muestra en un recipiente limpio.

- **Orina.** Recolectar 10 a 15 ml de orina recientemente emitida en un recipiente estéril, y enviarla directamente al laboratorio.
- **Líquido cefalorraquídeo (LCR).** Recolectar al menos 0,1 ml de LCR (mejor 2 o 3 ml), y transportarlo al laboratorio inmediatamente. Las condiciones de temperatura dependerán si será para estudios bacteriológicos o virales.
- **Sangre con anticoagulante (para diagnóstico molecular).** Recolectar sangre entera en un tubo estéril con EDTA (quelante de calcio), y enviarla directamente al laboratorio. La entrega rápida (2 a 6 horas) al laboratorio es esencial.
- **Suero (para pruebas serológicas).** Recolectar la muestra de sangre en un tubo estéril que no contenga anticoagulantes. Enviar la muestra al laboratorio (no congelar).

Las muestras clínicas deben enviarse lo antes posible al laboratorio dentro de un contenedor rígido, en bolsas individuales con material absorbente. La temperatura de conservación dependerá de la muestra en cuestión, y del estudio que se solicite. De ser enviadas al exterior, se debe cumplir con las normas internacionales reglamentadas por el Comité de Expertos en Transporte de Mercancías Peligrosas, del Consejo Económico y Social de las Naciones Unidas

## MÉTODOS

El cultivo y la identificación de los patógenos específicos, a partir de los materiales recogidos de los pacientes en los que se sospecha una infección, es la mejor herramienta diagnóstica disponible, aunque no la más rápida. En algunas situaciones dicho estudio resulta difícil o incluso imposible, por ejemplo en rickettsiosis y en la sífilis.

En algunos casos puede ser necesaria la serología u otros métodos, ya sea por que no se conocen las condiciones necesarias para su cultivo in vitro, o por los riesgos que implica la manipulación de estos microorganismos.

Hoy se dispone de técnicas para detectar y cuantificar muchos marcadores específicos de enfermedades infecciosas. Por un lado, se usan técnicas inmunológicas para cuantificar las inmunoglobulinas específicas o detección de antígenos en los tejidos; por otro lado, la introducción de la genética molecular en el laboratorio clínico, ha sido un gran avance al respecto.

Existen métodos directos e indirectos. Los **métodos directos** son aquellos que detectan al microorganismo por microscopía, por cultivo, y detectan a los antígenos del germen y los ácidos nucleicos. Para la detección de antígenos se usan técnicas inmunológicas como la inmunofluorescencia (IF), el enzimoinmunoanálisis (EIA) y los test de aglutinación.

Los **métodos indirectos** son aquellos que reconocen la respuesta inmune que desarrolla el huésped. Se basan en la detección de anticuerpos específicos mediante técnicas inmunológicas (EIA, IF, Western blot, etc.).

### Métodos directos

#### DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS

El microscopio de luz es una de las herramientas más útiles en el diagnóstico bacteriológico. Aún hoy con el desarrollo de métodos más rápidos, donde muchos requieren instrumentos sofisticados o caros, la simple visualización microscópica de muestras

clínicas es todavía la forma más rápida y específica de orientar el diagnóstico clínico. Basta recordar la utilidad del examen en fresco para la visualización de algunas bacterias, por ejemplo el examen en fresco con campo oscuro para *Treponema*, y las muestras fijadas y teñidas con coloraciones simples o diferenciales, como la coloración de Gram o de Ziehl Neelsen.

Existen distintos tipos de microscopios ópticos o de luz. El más usado en el laboratorio de bacteriología es el microscopio de campo claro (de luz transmitida), el resto (de campo oscuro, de contraste de fases, de luz ultravioleta) tienen uso más restringido.

El microscopio de luz consta de dos sistemas de lentes convergentes: el objetivo (próximo al objeto de estudio), y el ocular (próximo al ojo del observador). Posee un objetivo de bajo aumento (10X), uno de mediano aumento (40X), y uno de alto aumento (100X o lente de inmersión). Este último es el más usado en bacteriología, porque al sumergir el lente en el aceite que recubre el preparado, aumenta el poder de resolución a 0,2 micras, siendo posible observar la mayoría de los tipos bacterianos. El microscopio posee además una fuente de luz incluida o externa al instrumento, un condensador móvil, un espejo que refleja la luz, y un diafragma que permiten regular el paso de la luz concentrando los rayos luminosos sobre el objeto. Por último, tiene una platina para colocar la lámina de estudio, y un mecanismo de ajuste para enfocar el sistema de lentes sobre el objeto. Dicho mecanismo consta de un macrométrico (de ajuste grosero) que coloca al objeto próximo al foco y un micrométrico (de enfoque fino) que permite el enfoque del objeto.

La microscopía óptica es un método sencillo y rápido que muchas veces orienta al diagnóstico etiológico. Nos informa la cantidad y morfología bacteriana, además de la presencia de determinados tipos celulares presentes en el preparado, que validan o no la muestra para el análisis microbiológico; por ejemplo las células epiteliales en muestra de secreciones respiratorias.

El examen microscópico puede realizarse en fresco u obteniendo un frotis fijado y coloreado. El examen en fresco permite apreciar la existencia de bacterias, la presencia de movilidad de las mismas, y características de éstas. Esto último muchas veces orienta a la identificación de una cepa bacteriana o al diagnóstico etiológico.

Algunas bacterias como las espiroquetas, tienen un diámetro muy pequeño como para ser observadas en un microscopio de luz transmitida, por lo cual se usa el microscopio de campo oscuro que permite distinguir sus propiedades morfológicas y de movilidad. En este microscopio, la luz pasa a través de un condensador que proyecta luz transversalmente sobre la muestra, de modo que el haz de luz incide oblicuamente sobre la superficie del microorganismo siendo reflejado. Los rayos desviados son los que penetran en el objetivo, y hacen que los cuerpos bacterianos se observen rodeados de un halo brillante.

La microscopía de fluorescencia tiene los mismos principios de óptica, las diferencias están relacionadas con la generación y transmisión de la luz útil para la excitación de colorantes fluorocromos, o de fluorescencia natural de los microorganismos. Algunos producen luz después de absorber luz ultravioleta; otros lo hacen luego de haber tomado un fluorocromo, por ejemplo las bacterias ácido alcohol resistentes. Por último, otros producen luz luego de la unión del antígeno a un anticuerpo, conjugado previamente con un colorante fluorescente; este método es muy usado en virología y será expuesto con las técnicas inmunológicas.

La microscopía electrónica (ME) se utiliza para la visualización de los viriones presentes en los materiales clínicos. La morfología y el tamaño viral sirven como guía para el diagnóstico presuntivo. Existen dos técnicas usadas en la rutina, una es la tinción negativa de partículas, y la otra es la sección fina de células infectadas por virus.

La tinción negativa es el método más sencillo y rápido para detección y reconocimiento de partículas virales en materiales clínicos. Se usan sales pesadas como el ácido fosfotungstico o el acetato de uranilo, que potencian el contraste en las imágenes de las partículas. La formación de la imagen depende del resultado de la dispersión de electrones por estructuras electrónicamente densas. Como las estructuras biológicas son poco densas no producen dispersión, por tanto los electrones pasan a través de los virus y no por el entorno metálico.

Cuando la cantidad de partículas es restringida, se utiliza la inmuno electro microscopía (IEM), que consiste en incubar el material con un anticuerpo específico, donde los viriones se agrupan, permitiendo identificar la partícula viral presente. La IEM ha sido muy usada para el reconocimiento de rotavirus, y para detectar virus de Hepatitis B en suero de pacientes.

La ME sección fina es una técnica más compleja que se utiliza para estudiar la interacción del virus con la célula infectada (ver figura 5.1)

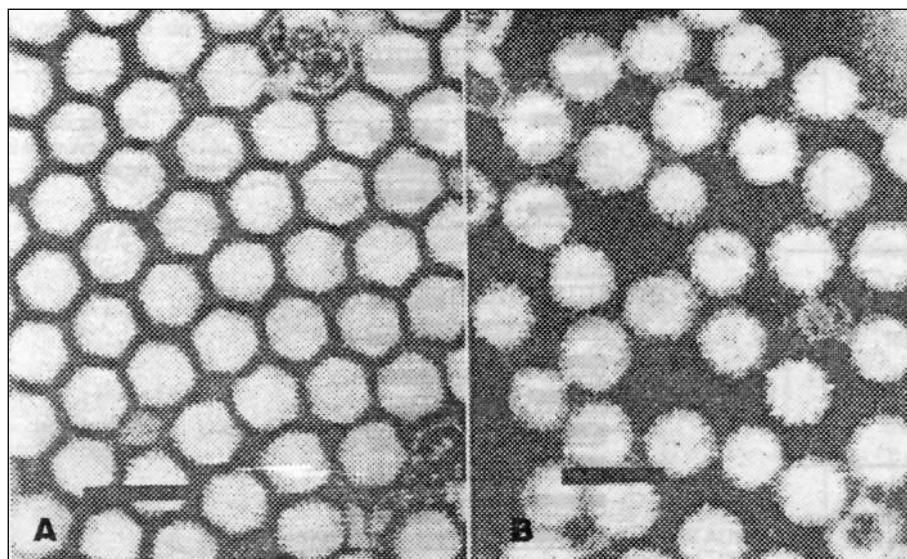
#### AISLAMIENTO Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS VIABLES

El cultivo es aún el *gold standard* y una herramienta importante de diagnóstico. Permite además, identificar el microorganismo aislado, realizar estudios de sensibilidad a los antibióticos y antivirales, y tipificar el microorganismo con fines epidemiológicos.

Para el microbiólogo el problema es decidir cuál o cuáles de los microorganismos aislados en una muestra clínica están involucrados en la enfermedad en cuestión.

**Figura 5.1.**

**Microfotografía electrónica de virus visualizados en heces de pacientes con diarrea.**  
A- Adenovirus. B- Rotavirus.



Son pocos los microorganismos a los cuales el término “patógeno” puede aplicarse invariablemente, definiendo patógeno aquel microorganismo que siempre que se encuentra estará causando una enfermedad infecciosa. La mayoría pueden integrar la flora del huésped que es dinámica en su composición. Por lo tanto, es interesante definir los sitios estériles y los que poseen flora, aunque no existen categorías claras que delimiten entre especies patógenas e inocuas. Las conclusiones tendrán en cuenta los criterios establecidos en la elección y toma de la muestra.

Como regla general, la elección de métodos y medios de cultivo se ajusta a la naturaleza, al origen de la muestra, y a los interrogantes que se pretende responder. Por ejemplo para una muestra de pus drenada de un absceso: ¿cuáles microorganismos están presentes como agentes causales? Se supone que cualquier microorganismo presente puede ser el causal, y que el tratamiento dirigido hacia él debe resultar beneficioso. La estrategia a seguir debe ser recuperar todos los microorganismos presentes sea cual sea. El método será utilizar varios medios de cultivo y enriquecimiento. En contraste con este enfoque abierto, algunos cultivos se realizan para determinar si un patógeno particular está presente o no. Por ejemplo en un exudado faríngeo, ¿cuáles microorganismos están presentes como agentes causales? En primer lugar pensamos en *Streptococcus pyogenes*. La estrategia a aplicar debe ser investigar un único agente tratable y cultivable. Por lo tanto el método será usar medios de cultivo solo para *Streptococcus pyogenes*.

De esto se desprende que existen muchos medios de cultivo con diferentes propósitos. Por un lado, existen los medios simples que permiten el desarrollo de microorganismos con gran capacidad metabólica, que con pocos nutrientes son capaces de extraer todo lo necesario para multiplicarse. Por el contrario, existen medios complejos que agregan diferentes sustancias necesarias a algunos microorganismos.

Los medios de cultivo también pueden definirse como determinados, aquellos que tienen su composición químicamente definida, o aquellos no bien definidos. Para el cultivo pueden usarse medios de cultivo diferenciales que ponen en evidencia alguna característica metabólica de algún grupo de bacterias. También pueden usarse medios selectivos que inhiben el desarrollo de algunos microorganismos, permitiendo el desarrollo particular de otros.

Por último, los medios de enriquecimiento son medios líquidos que facilitan el desarrollo de algunos microorganismos y pueden inhibir la flora asociada, y modificando la relación cuantitativa entre estos. El aislamiento posterior en medios sólidos permite la recuperación de estas bacterias.

En el laboratorio de bacteriología clínica cuando se realizan estos cultivos, hay que considerar su sensibilidad para las diferentes muestras. No es lo mismo el diagnóstico de infección urinaria por urocultivo (técnica de sensibilidad alta), que el diagnóstico de neumonía por cultivo de esputo (técnica de sensibilidad muy baja).

Otro elemento importante a considerar es la valoración de resultados positivos. El microorganismo aislado de un sitio normalmente estéril, ¿es un contaminante?; ¿forma parte de la flora normal de otros sitios en el huésped? Un ejemplo interesante es cuando se realiza una única muestra de hemocultivo, y se aísla *Staphylococcus epidermidis*, siendo éste un aislamiento en sangre normalmente estéril, de un microorganismo que normalmente habita la piel del ser humano. Es imperativo en estas situaciones tener más de una muestra para poder interpretar estos resultados, y definir si es una contaminación accidental, o el microorganismo aislado es el responsable de la enfermedad.

Las pruebas de identificación de las bacterias aisladas y los estudios de sensibilidad se describen en los capítulos respectivos.

#### **DETECCIÓN DIRECTA DE PARTÍCULAS VIRALES INFECTIVAS**

En el estudio de detección directa de las partículas virales infectivas es necesario realizar el aislamiento viral y su posterior *identificación*.

#### **Aislamiento viral**

Detecta al virus como agente infeccioso. Dado que los virus son parásitos intracelulares obligados, requieren células vivas para su replicación, es decir se necesita trabajar en determinados biosustratos para detectar la capacidad infectiva del virus presente en la muestra clínica.

Existen varios tipos de biosustrato para el aislamiento viral, como ser los huevos embrionados, animales de experimentación, o bien cultivos celulares “*in vitro*”.

#### **Huevos embrionados (de gallina o pato)**

Se pueden inocular embriones en diversas etapas del desarrollo. Luego de inoculada la muestra clínica, se incuban a 33°C y se examinan diariamente para verificar su viabilidad. Los métodos estandarizados permiten la inoculación de la membrana corioalantoidea, amnios, alantoides, saco vitelino o el embrión. Después de una incubación adecuada, se separa y se examina el líquido o tejido, en busca de proliferación viral y/o lesiones de membrana. Este biosustrato es utilizado para el aislamiento de varios virus, entre ellos el virus de la influenza.

#### **Animales de experimentación**

Solo algunos laboratorios especializados trabajan con animales (ratones, ratas, cobayos, conejos, monos). Cuando se utilizan crías de ratón (menos de 48hs de vida), la inoculación se realiza intracerebral, intranasal o intraperitoneal. La replicación del virus se manifiesta por signos determinados, como por ejemplo con los *Coxsackie virus* los animales presentan una parálisis característica, o bien la muerte del animal.

#### **Cultivos Celulares**

Es el biosustrato más usado actualmente en la propagación de los virus. Un cultivo celular es obtenido de explantes de órganos o de embriones de animales. Estas células obtenidas asépticamente, se disocian por acción de una enzima (tripsina), que actúa intercelularmente. Las células son disgregadas mecánica y enzimáticamente en unidades individuales. La suspensión de células libres así obtenidas, se coloca en la superficie plana de un recipiente de vidrio o de plástico, donde se adhieren y multiplican formando una capa fina de células denominada monocapa celular. Ésta, crece en un medio de cultivo complejo que contiene albúmina, vitaminas, sales, glucosa, etc., en un sistema buffer (pH entre 7,2 -7,4), generalmente a 37°C. Se previene la contaminación bacteriana agregando antibióticos al medio de cultivo.

Los cultivos celulares en monocapa son los más usados, aunque hay otros sistemas como los cultivos en suspensión, explantes, cultivos de órganos, cultivos en *microcarriers*, etc.

Los cultivos celulares se dividen en primarios, diploides, y líneas celulares continuas.

El **cultivo primario** obtenido directamente del tejido u órgano, está constituido

por células diploides e iguales morfológicamente a la células que le dieron origen, y pueden subcultivarse una o dos veces.

Las **líneas celulares diploides**, crecen en pasajes sucesivos hasta aproximadamente 50 subcultivos, y conservan por lo menos en un 75% el cariotipo correspondiente a la especie de la cual provienen.

Las **líneas celulares continuas**, se establecen a partir de tejidos tumorales o normales de humanos, o animales luego de sufrir una transformación espontánea. Estas líneas continuas tienen un cariotipo heteroploide, y pueden ser subcultivadas un número infinito de veces por lo cual se las denomina “células inmortales”. Para considerar que se ha logrado establecer una línea continua, ésta debe haber sido subcultivada por lo menos 70 veces. Estas líneas celulares continuas ofrecen las siguientes ventajas: disponibilidad para todos los investigadores de stocks de células idénticas, ya sea congeladas en ampollas o en monocapa en botellas de cultivo, con la posibilidad de reconstituir las cuando sea necesario; facilidad relativa del pasaje y mantenimiento en todos los laboratorios; y ser libres de contaminación con agentes extraños.

Los distintos cultivos celulares varían en cuanto a su susceptibilidad a los diferentes virus, ya que existe una relación específica entre el huésped y el virus, que está en relación con los datos clínicos, y el tipo de muestra a inocular. Así por ejemplo la línea celular HEp-2, son células heteroploides humanas derivadas de carcinoma laríngeo, y se recomiendan para virus sincicial respiratorio y adenovirus.

La MRC5, es una línea diploide fibroblástica de pulmón embrionario humano, que se usa para el aislamiento del citomegalovirus, el virus sincicial respiratorio, herpesvirus, Echovirus, etc.

La MDCK, es una línea celular diploide de riñón canino que se recomienda para el aislamiento del virus Influenza.

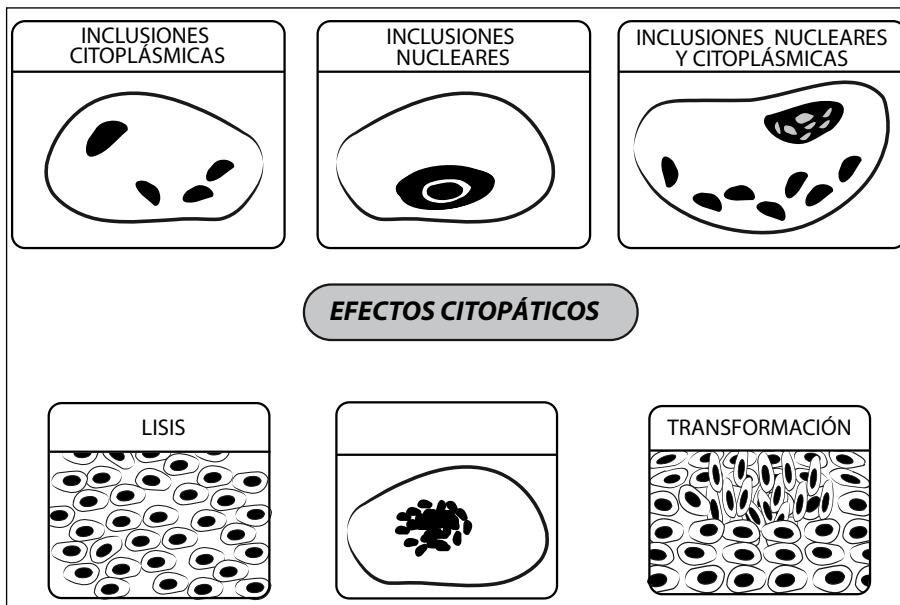
El resultado de la interacción específica entre un virus y una célula huésped determinada, puede ser evaluado en función de los procesos de replicación viral, y del efecto producido en las mismas. En muchas ocasiones es posible observar con el microscopio óptico sin ningún tipo de tinción, las alteraciones morfológicas que inducen algunos virus en las células infectadas, denominado **efecto citopático** (ECP).

Las manifestaciones tempranas del ECP en cultivos celulares, se producen por el edema celular asociado con alteraciones en la permeabilidad de la membrana, lo que determina cambios en el retículo endoplásmico, polirribosomas y mitocondrias, que producen un reordenamiento celular (ver figura 5.2).

Las principales ECP se resumen a continuación:

- Muchas células mueren por necrosis implicando un aumento del tamaño celular que conduce a la lisis, iniciado por un desequilibrio osmótico fundamentalmente asociado a la entrada de  $\text{Ca}^{++}$  a las células, y perturbación de procesos propios celulares.
- Producción de cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión pueden corresponder a acumulos cristalinos de partículas virales, como se observa en algunas inclusiones intranucleares, o pueden representar “fábricas” de síntesis y ensamblaje de componentes subvirales. También pueden ser depósitos de antígenos virales sintetizados en exceso.
- Formación de sincios. Algunos virus producen la fusión de las membranas celulares, como resultado de lo cual se forma una masa citoplasmática “gigante” que contiene múltiples núcleos, a esto se le da el nombre de sincios

Es importante determinar el tiempo en que el ECP aparece y progresá, ya que

**Figura 5.2. Efectos Citopáticos en la infección viral**

es variable en los diferentes virus animales. Por ejemplo, enterovirus y herpesvirus en uno o dos días desarrolla ECP, mientras que citomegalovirus o rubéola pueden demorar semanas hasta que se observe el ECP característico.

La técnica de hemadsorción se basa en la capacidad de los glóbulos rojos de determinada especie animal, de unirse a proteínas virales (hemaglutininas) que están siendo incorporadas a la membrana plasmática de las células infectadas. Agregando glóbulos rojos a la monocapa infectada, se pone de manifiesto la presencia o no de proteínas hemaglutinantes, es decir, presencia o no de virus que producen hemaglutininas (ejemplo virus de la influenza.)

#### **Identificación viral**

Si bien existen ECP característicos producidos por determinados virus en determinadas células, esta instancia al igual que la hemadsorción, no es concluyente en el diagnóstico. Si bien nos “guiará”, debemos identificar el virus en cuestión. Para ello nos valemos de su comportamiento durante la infección, y de sus componentes como el ácido nucleico, proteínas estructurales, proteínas que se presentan en las células infectadas, producción de hemaglutininas, etc.

Es así que detallaremos someramente una serie de técnicas de identificación en cultivos celulares infectados y/o en la muestra clínica.

Estas técnicas son inmunofluorescencia (IF), inhibición de la hemoaglutinación (IHA), test de neutralización, enzimoinmunoanálisis (EIA), y detección de ácidos nucleicos virales.

- Inmunofluorescencia (IF). Permite detectar la presencia de抗ígenos virales en células infectadas, mediante el agregado de anticuerpos específicos marcados con sustancias fluorescentes (ejemplo isotiocianato de fluoresceína, tetracil isotiocianato de rodamina) Las células infectadas se fijan a un portaobjetos. Sobre ellas

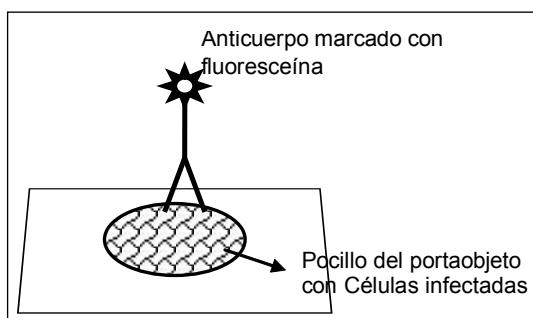
se agregan anticuerpos marcados con fluoresceína, que se unen a determinadas proteínas virales (en caso de estar presentes), producidas durante la replicación. Esta unión antígeno anticuerpo (Ag-Ac) se manifiesta en la observación de fluorescencia en las células infectadas, mediante el uso de un microscopio de fluorescencia, con fuente de luz ultravioleta (UV) (ver figura 5.3)

- Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA). Una vez que se puso de manifiesto la presencia de proteínas hemoaglutinantes en el cultivo viral infectado, es necesario identificar el virus en cuestión. La IHA se fundamenta en el bloqueo de las proteínas virales hemoaglutinantes, presentes en el sobrenadante del cultivo por anticuerpos específicos, de tal forma que al agregar los glóbulos rojos, no se produce la hemoaglutinación. Sabiendo los anticuerpos que se colocaron, se podrá identificar el virus en cuestión.
- Test de Neutralización. El fundamento de esta técnica, consiste en agregar anticuerpos neutralizantes específicos que se unen a los antígenos virales de la partícula viral, impidiendo de esta forma infectar la célula susceptible. En ausencia de anticuerpos neutralizantes específicos, el virus infecta las células, y se observa el ECP característico (ver figura 5.4)
- Enzimoinmunoanálisis (EIA). Luego de hacer una extracción de proteínas del cultivo infectado, se aplica la técnica de EIA con anticuerpos específicos conocidos (ver más adelante detalle de la técnica).
- Detección de ácidos nucleicos virales. Se realizará la extracción de ácidos nucleicos totales del cultivo celular infectado, y con técnicas de biología molecular (RT-PCR o PCR) se identifica la presencia del ácido nucleico viral (RNAv o DNAv).

#### DETECCIÓN DE ANTÍGENOS

La detección de antígenos es un método directo pero no requiere de la partícula infectiva como tal, es decir se basa en el reconocimiento de las proteínas del microorganismo, presentes en la muestra clínica o en el cultivo. Esto se realiza a través de una reacción Ag-Ac. En estos métodos lo desconocido es el antígeno del microorganismo en estudio, y lo conocido es el anticuerpo que se utiliza para identificarlo.

La especificidad de los antisueros de uso corriente en el laboratorio, suele ser muy variada. Generalmente, los microorganismos son un mosaico de antígenos expuestos. Según su especificidad podemos encontrar tres tipos de inmunoglobulinas: policlónicas, monoespecíficas y monoclonales. Por ejemplo supongamos que dos bacterias A y B son diferentes; que la bacteria A presenta en su superficie tres antígenos diferentes, y que la bacteria B posee un antígeno idéntico al de la bacteria A, un antígeno propio y único, y un antígeno que reacciona en forma cruzada con A. Un antisuero polyclonal



**Figura 5.3.**  
Esquema de IF directa

contra la bacteria A, la reconocerá en todos sus antígenos, pero también reconocerá a B por el antígeno idéntico al de A, y por aquel que tiene reacción cruzada con A. Si pensamos en un antisuero monoespecífico contra el antígeno en que B tiene reacción cruzada con A, también reconocerá las dos bacterias, tanto por reconocimiento específico, como por reacción cruzada. Por último, un anticuerpo monoclonal solo reconocerá a la bacteria A, dado que no hay posibilidades de reacción cruzada.

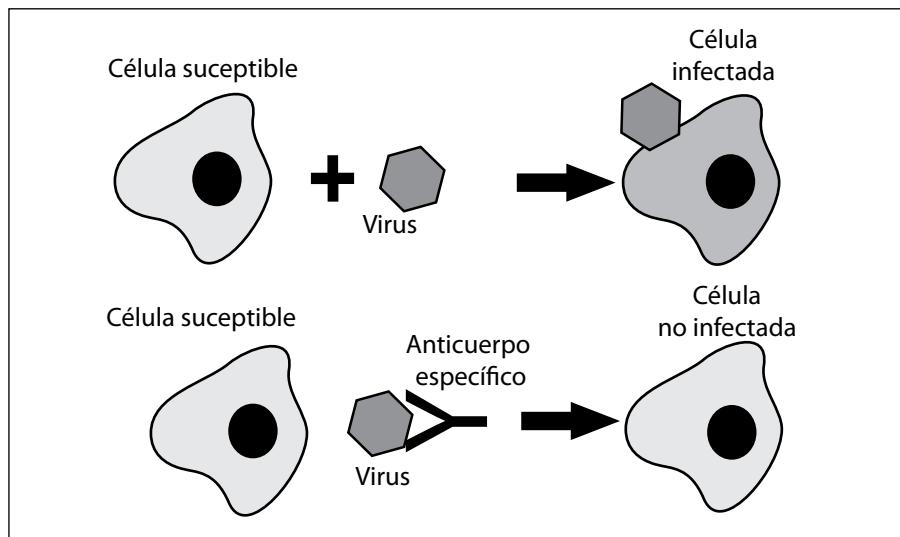
Es importante destacar que generalmente, todas las pruebas mejoran la especificidad y sensibilidad con los anticuerpos monoclonales, pero su uso debe ser valorado junto a las necesidades, los costos, etc.

Las técnicas que se basan en **aglutinación de partículas** son muy usadas y de fácil realización, como por ejemplo la aglutinación de látex o la coaglutinación, que usa *Staphylococcus aureus* y su proteína A fijadora de inmunoglobulinas. La prueba de aglutinación es un método sencillo, de un solo paso. Además es una técnica rápida y barata. Los ensayos de aglutinación dependen de la fijación inicial de anticuerpos o de los antígenos específicos sobre eritrocitos o partículas de látex. Luego este reactivo se incuba con la muestra clínica, en la que se investiga el antígeno o los anticuerpos, y donde las partículas se aglutan si el antígeno o anticuerpo adecuado se encuentra presente. La prueba de aglutinación ha sido usada para detectar el antígeno (el más importante) de Rotavirus en heces, mostrando buena sensibilidad cuando se lo compara con el EIA para rotavirus. También se ha usado para detectar antígeno de adenovirus (ver figura 5.5)

Las técnicas de análisis inmunoabsorbente ligado a enzima (enzimoinmunoensayo ELISA) que usan anticuerpos unidos a enzimas que catalizan reacciones colorimétricas, son de uso corriente. Los ELISA para la detección de antígenos, se basan en la "captura" del antígeno por anticuerpo específicos unidos a una fase sólida, generalmente el pocillo de una microplaca o una esfera de plástico pequeña. El antígeno viral presente en la muestra clínica se combina con el anticuerpo fijado a la fase sólida, y el

**Figura 5.4.**

Esquema del test de neutralización



antígeno viral se detecta mediante la adición de otro anticuerpo específico conjugado a una enzima. La enzima conjugada suele ser peroxidasa o fosfatasa alcalina. En la reacción con peroxidasa el substrato es un peróxido capaz de oxidar un compuesto químico incoloro, que en su forma oxidada tiene un color característico. Si la enzima es fosfatasa, la desfosforilación es la responsable directa de la aparición del color (ver figura 5.6).

Las **técnicas inmunomicroscópicas** que usan la inmunofluorescencia (IF), también son usadas para la detección de antígeno presentes en la muestra clínica (el fundamento fue explicado anteriormente). En este caso lo que se coloca en el portaobjetos es la muestra clínica, por ejemplo las células del lavado nasal o de hisopado nasofaríngeo. El uso de anticuerpos monoclonales ha incrementado la especificidad y en algunos casos la sensibilidad de estos ensayos. Los anticuerpos monoclonales conjugados con isiotiocianato de fluoresceína pueden usarse para identificar el virus sincicial respiratorio, influenza A y B, parainfluenza 1,2 y 3 y adenovirus entre otros. También permite subtipificar especies virales como por ejemplo el virus herpes simple de tipo 1 y 2. Esta técnica requiere solo dos a cuatro horas, y se le ha reportado una sensibilidad del 70-80 % comparada con los cultivos celulares para la identificación del virus herpes simple, 80-95% para el virus sincicial respiratorio, y 71% para el influenza A.

La **tinción con inmunoperoxidasa** es similar a la de IF, y es la técnica de elección en algunos laboratorios. El procedimiento requiere algunos pasos adicionales, dado que en este caso el anticuerpo monoclonal está marcado con una enzima que requiere la adición de un substrato, para evidenciar la reacción por un cambio de color visible micro y macroscópicamente.

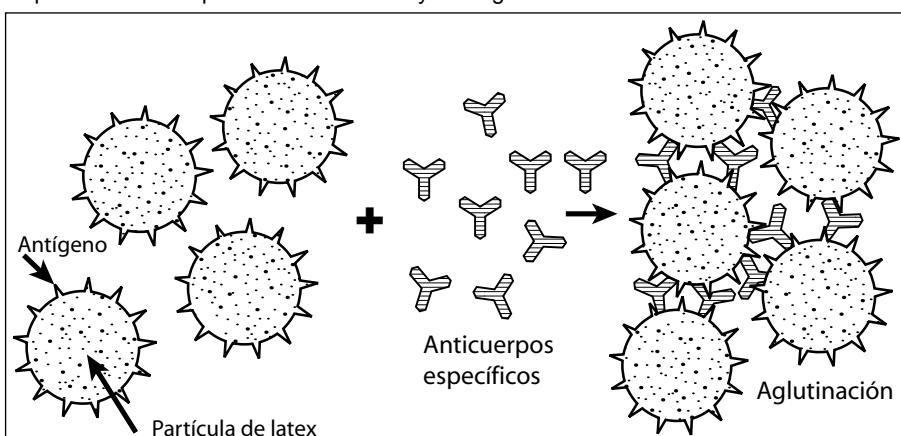
#### DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

En los últimos años, ha ganado aceptación en el laboratorio clínico el uso de técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos. La combinación del reconocimiento de fragmentos de ácidos nucleicos por medio de sondas y/o la amplificación previa, continúan en desarrollo. Trataremos aquí los principios básicos de algunas técnicas.

- Técnicas de hibridación. Las reacciones de hibridación se basan en la propiedad

**Figura 5.5.**

Representación esquemática de un ensayo de aglutinación.



**Figura 5.6.**

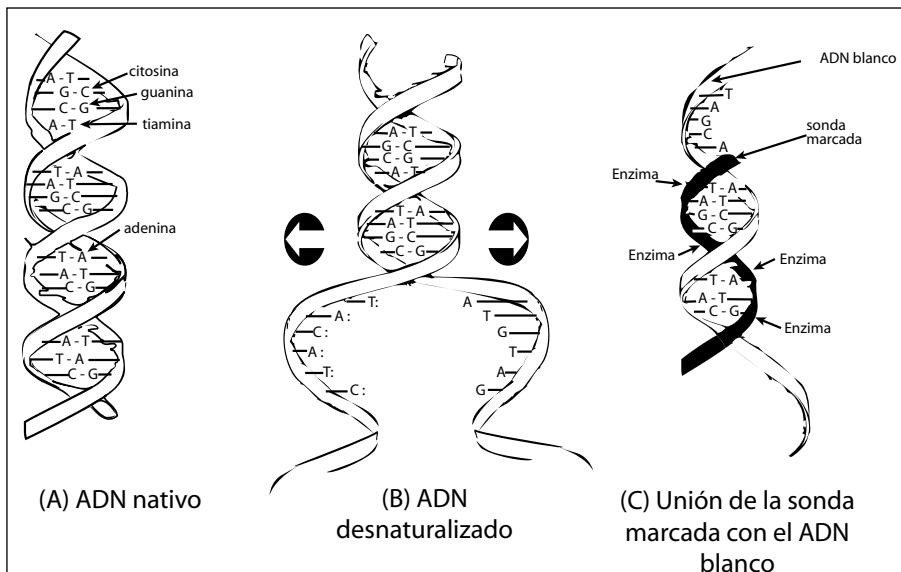
Esquema para la detección de antígenos por enzima inmuno ensayo directo

PROCEDIMIENTO	PRUEBA POSITIVA	PRUEBA NEGATIVA
1. Los anticuerpos (Y) contra el virus (') se fijan a las paredes de la placa de microtitulación.		
2. Adicionar la muestra del paciente (heces, secreciones, suero, etc.) sospechosa de contener partículas virales o antígenos de virus y lavar los pozos con solución amortiguadora.		
3. Adicionar anticuerpo anti-virus al que contiene una enzima conjugada.		
4. Lavar con solución amortiguadora.		
5. Adicionar sustrato para la enzima y medirla cantidad de producto de color (●).		
	Intensidad de color.	++++

de los ácidos nucleicos de desnaturizarse y naturalizarse frente a cambios de temperatura. Utilizando esta propiedad y un ácido nucleico conocido y marcado (con enzimas o radioisótopos), se desnaturiza el material problema (DNA viral o bacteriano o de RNA viral). Este ácido nucleico al naturalizarse, atrapará las secuencias complementarias del ácido nucleico marcado conocido que se ha agregado. Dependiendo de como esté marcada la sonda, se detectará la hibridación por una reacción enzimática colorimétrica, o mediante la lectura en un contador gamma (en el caso de sondas marcadas con radioisótopos). También se puede realizar la electroforesis del DNA hibridado con la sonda marcada en gel de poliacrilamida, y detectar la radioactividad emitida por la sonda mediante la aplicación de una placa

**Figura 5.7.**

Hibridación de DNA con una sonda marcada



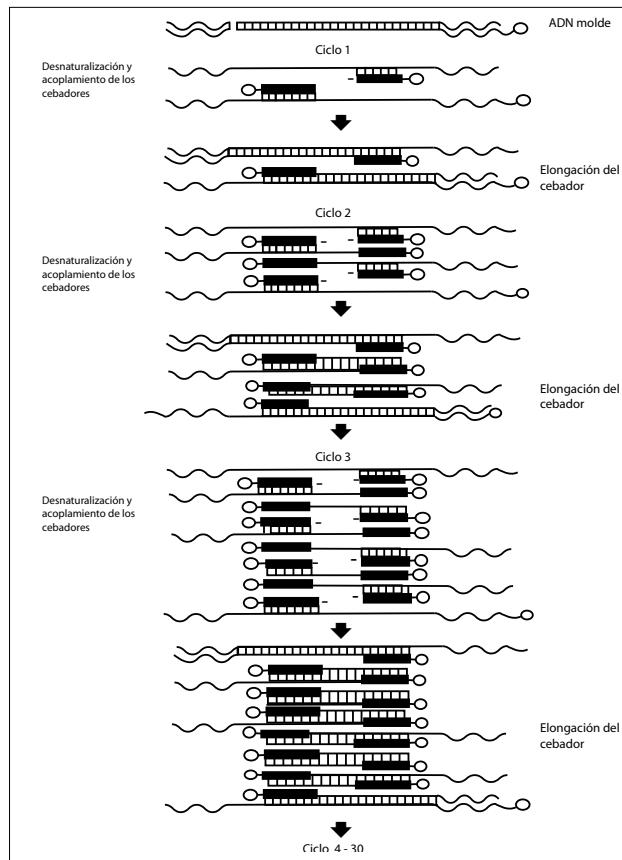
de rayos X (autoradiografía). Citomegalovirus, papilomavirus y virus Epstein-Barr, han sido identificados usando sondas de ácidos nucleicos (ver figura 5.7).

- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La reacción en cadena de la polimerasa se utiliza para amplificar secuencias de DNA presentes en la muestra problema. Cuando se trata de un virus RNA, se realiza un paso previo de retrotranscripción del RNA viral a DNA copia, de tal manera de ingresar al proceso de la PCR.

La PCR fue desarrollada por Saiki et al., para aumentar el número de moléculas de DNA blanco en las muestras. Tiene una sensibilidad tan alta que puede amplificar una única molécula de DNA, y una sola copia de genes puede ser extraída de mezclas complejas de secuencias genómicas, y ser visualizada como bandas diferentes en geles de agarosa. Esta técnica, consiste en una amplificación de secuencias específicas del DNA. Se basa en el uso de secuencias cortas de nucleótidos sintéticos llamados *primers* o cebadores, que se hibridan específicamente en los extremos de la región que se desea amplificar. Para que la reacción se produzca se usa una enzima DNA polimerasa termoestable (en general Taq polimerasa), deoxinucleótidos trifosfatos, los primers específicos para la secuencia a amplificar, junto con la muestra de DNA a utilizar como molde para la replicación. La polimerasa sintetizará nuevas cadenas de DNA a punto de partida del molde tomando como inicio los primers previamente hibridados con el molde. Se realiza una serie repetida de ciclos, cada uno compuesto por tres pasos básicos: desnaturalización del DNA de doble cadena a altas temperaturas (94-95°C); acoplamiento o hibridación de los cebadores con una temperatura que dependerá de la secuencia de los primers (en general entre 50 y 60°C), y un tercer paso de extensión o elongación de la nueva molécula de DNA que utiliza una temperatura de 72°C que es el óptimo para el funcionamiento de la Taq polimerasa.

Al final se consiguen miles de copias del fragmento de DNA comprendido entre ambos cebadores. Los fragmentos de DNA obtenidos se pueden identificar por va-

**Figura 5.8.**  
Esquema de PCR



rias técnicas como la visualización en geles de agarosa o poliacrilamida con tinción con bromuro de etidio, y examen con luz ultravioleta o hibridación con una sonda marcada (ver figura 5.8).

Aunque todavía son costosos estos métodos de microbiología molecular, ya tienen su espacio en el laboratorio clínico. Son útiles en la investigación de algunas bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, *Rickettsia* spp., y *Mycoplasma*. También se usan para la detección de genes que le confieren a la bacteria resistencia a algunos antibióticos, por ejemplo la meticilina resistencia de *Staphylococcus aureus* y las betalactamasas de *Neisseria gonorrhoeae*. En virología han introducido importantes cambios en el diagnóstico de enfermedades, tales como la encefalitis herpética y otras enfermedades neurológicas virales, la infección por VIH del recién nacido, y la infección por papilomavirus humano. Así también se han implementado test de resistencia a antivirales usando técnicas de biología molecular, donde en base a la secuencia nucleotídica presente en el virus, se define el tipo de resistencia que presenta.

### Métodos indirectos

Los métodos indirectos estudian la respuesta de anticuerpos (IgM, IgG, e IgA) en el huésped.

Permanentemente se están produciendo innovaciones tecnológicas en materia de test de diagnóstico serológico, ya sea por su rapidez, aumento de la sensibilidad, así como el uso de tecnología automatizada.

Para poder hacer una buena interpretación de los resultados que se obtienen es necesario conocer los principios, aplicaciones y limitaciones de estos test.

Una infección provoca respuestas inmunitarias dirigidas contra uno o más抗igenos, que presentan tanto los virus como las bacterias. En general se generan respuestas inmunitarias celulares y humorales, y la medición de unas u otras puede ser la base para diagnosticar la infección.

Los anticuerpos de clase IgM son los primeros en aparecer, seguidos por los de clase IgG. Los anticuerpos de IgM desaparecen en varias semanas en tanto que los de IgG persisten por varios años.

El fundamento del diagnóstico serológico consiste en demostrar en el suero del paciente la presencia de anticuerpos específicos contra el agente infeccioso. Para poder realizar un diagnóstico de infección reciente mediante serología existen 2 métodos: la seroconversión, y la determinación de presencia de IgM específica.

La *Seroconversión* se define como la aparición de anticuerpos o el aumento de su título en más de 4 veces, en 2 muestras pareadas de suero. La primera obtenida durante el período agudo, y la segunda en la convalecencia, 14 a 21 días después de la primera muestra.

La detección de la conversión serológica permite realizar diagnóstico de infección reciente con toda certeza. Es importante la obtención temprana del suero precoz, debido a que los anticuerpos pueden aumentar tempranamente en algunas infecciones, y el aumento de 4 veces en el título, que es necesario demostrar para determinar una seroconversión, puede no llegar a ser detectado si el suero del período agudo se obtiene demasiado tarde. La toma de muestra en el período convaleciente es útil para diagnóstico retrospectivo o epidemiológico.

La detección de IgM específica permite realizar con certeza un diagnóstico de infección reciente, aún con una sola muestra de suero obtenida en el período agudo de la enfermedad, o en la convalecencia temprana. Dado que la IgM no atraviesa placenta, su detección en sangre de cordón indica fehacientemente una infección adquirida intraútero.

Los métodos usados en la detección de anticuerpos, se basan en evidenciar la reacción Ag-Ac que se genera.

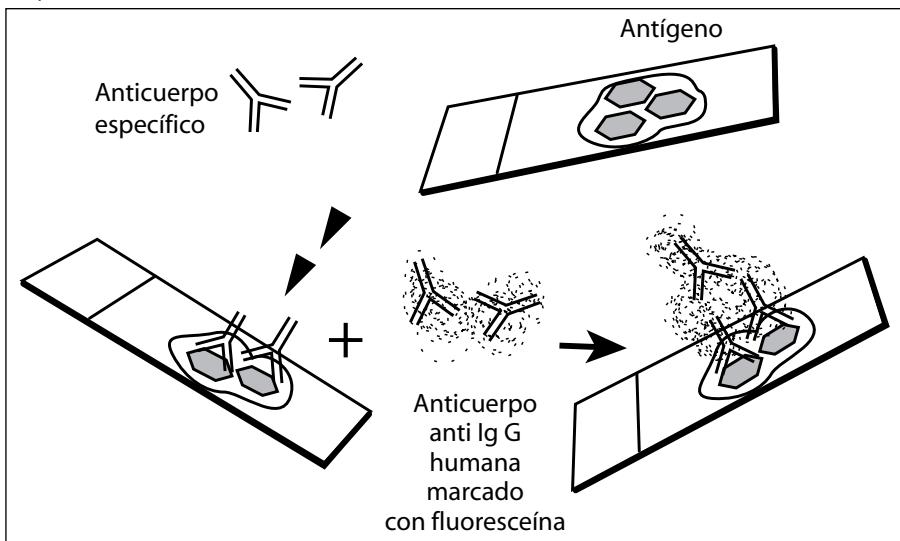
En todas estas técnicas indirectas, la variable a investigar es el anticuerpo presente en el suero del paciente, mientras que el antígeno es el conocido por el laboratorio según el objetivo propuesto en la investigación.

Algunas de las técnicas empleadas ya las hemos fundamentado cuando nos referimos a la detección de antígenos, pero aquí se aplican para la búsqueda de anticuerpos producidos por la infección en el paciente.

- La Inmunofluorescencia indirecta (IFI) es un método rápido y confiable para la determinación de anticuerpos en el suero del paciente. El principio de la técnica se ilustra en la figura 5.9. Se basa en la unión del anticuerpo presente en el suero del paciente, con los antígenos expresados en la superficie y el citoplasma de las células infectadas, que han sido fijadas a un portaobjetos de vidrio. Como control de especificidad se usan células no infectadas. Primero se incuba el suero del paciente con las células infectadas y no infectadas; luego se realiza un lavado con

**Figura 5.9.**

Esquema de inmunofluorescencia indirecta



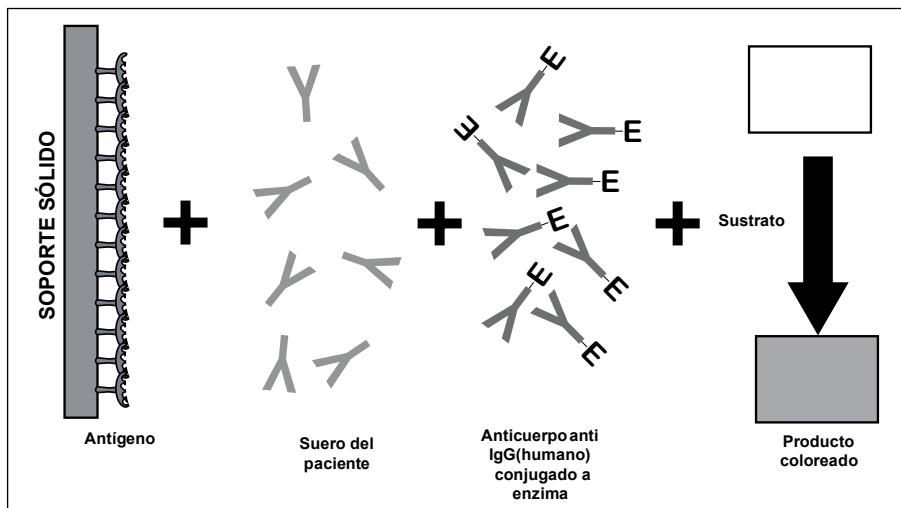
solución amortiguadora y se agregan anticuerpos contra la IgG humana conjugada con isotiocianato de fluoresceína. Éste último es una sustancia que se vuelve fluorescente a la exposición de la luz ultravioleta y emite una luz de color verde característica. El conjugado se unirá a los anticuerpos del paciente si la reacción es positiva, leyéndose la prueba en un microscopio de fluorescencia. La presencia de anticuerpos se evidencia por la aparición de fluorescencia en el citoplasma y la superficie de las células infectadas, mientras que las células control no quedan fluorescentes, y generalmente se ven de color rojo.

- En el test de neutralización, la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero, bloquea las estructuras virales y como consecuencia no se observa ECP en los cultivos.
- En los ensayos de aglutinación, el suero es incubado con antígenos artificialmente sensibilizados a la superficie de partículas inertes como látex, bentonita o glóbulos rojos. En presencia de anticuerpos específicos, las partículas aglutinan formando una malla en el fondo del tubo o placa.
- Los ensayos inmunométricos generalmente se diseñan en microplacas, aunque existen otros soportes como esferas, tirillas, tubos, etc. Hay una gran variedad de instrumental semi y automatizado tanto para la lectura, como para los lavados, incluyendo lectores espectrofotométricos o de quimioluminiscencia especiales para estas técnicas. Estas técnicas pueden ser cualitativas o cuantitativas (ver figura 5.10).
- La técnica de Western blot (WB) tiene muchas aplicaciones en el diagnóstico virológico. Son particularmente útiles para el diagnóstico del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Dicha técnica se basa en la separación electroforética de proteínas virales, que son posteriormente inmovilizadas en papel de nitrocelulosa, con el objeto de determinar la presencia de anticuerpos específicos contra cada una de esas proteínas. Se realiza esquemáticamente en tres pasos. En el primero se

realizan cultivos celulares de grandes cantidades de virus, que luego son tratados químicamente para su disagregación e inactivación. Los antígenos resultantes del lisado viral se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida. A continuación se realiza una transferencia (blotting o electrotransferencia) de los antígenos separados a membranas de nitrocelulosa. Por último se coloca el suero del paciente en la membrana de nitrocelulosa, y se agregan anticuerpos anti-inmunoglobulina humana unida a una enzima (peroxidasa o fosfatasa alcalina); finalmente se agrega el substrato enzimático para la visualización de las bandas reactivas con un producto final coloreado. Esta técnica es similar a un EIA, aunque menos sensible pero más

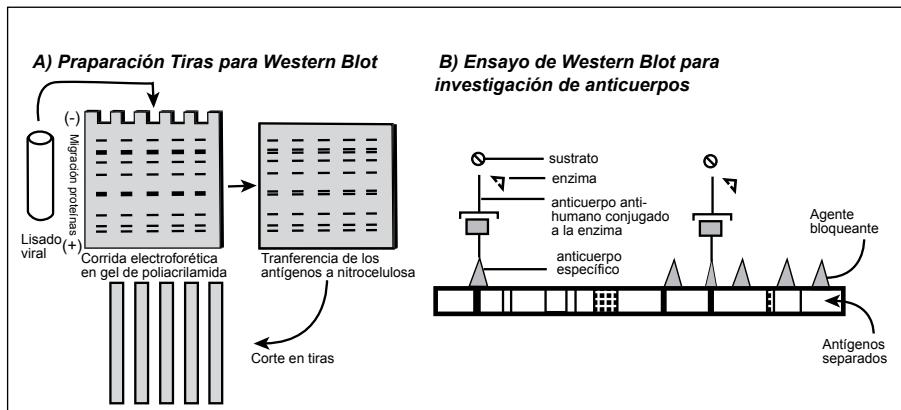
**Figura 5.10.**

Esquema de ELISA para detección de anticuerpos



**Figura 5.11.**

Esquema de Western Blot para la detección de anticuerpos



específica. En la práctica, solamente el tercer paso se realiza en los laboratorios de diagnóstico, dado que los equipos comerciales proveen tirillas con los antígenos; esto facilita la estandarización de las determinaciones (ver figura 5.11).

## BIBLIOGRAFÍA

- Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilgert C. Zinsser editores. Microbiología. 20<sup>a</sup> ed. BsAs: Panamericana;1994.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC (h), editores. Diagnóstico Microbiológico, Texto Atlas Color. 5<sup>a</sup> ed. Bs As: Panamericana; 1999.
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey & Scott's editors. Diagnostic Microbiology. 11th. ed. St. Louis, Missouri: Mosby; 2002.
- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH, editors. Manual of Clinical Microbiology. 8th. ed. Washington, D.C: ASM Press; 2003.
- Rose NR, Hamilton RG, Detrick B, editors. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 6th. ed. Washington, D.C: ASM Press; 2002.
- Transporte de Sustancias Infecciosas. Información general sobre las enmiendas a la 13<sup>a</sup> revisión de la Reglamentación Modelo de las Naciones Unidas en lo relativo al transporte de sustancias infecciosas. Organizacion Mundial de la Salud, 2004. <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CSR%20Trspt%20Doc%20sp.pdf>
- Knipe DM, Howley PM, editors. Fields Virology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.

# 6

# Interacciones huésped-parásito. Infección y enfermedad.

## Flora normal

*M. P. Gadea, M. E. Torres*

### **INTRODUCCIÓN E IMPORTANCIA DEL TEMA**

La microbiología médica estudia las interrelaciones entre los seres humanos y los microorganismos como las bacterias y los virus, dirigiendo su atención principal a las enfermedades producidas por este tipo de interacciones. Como veremos a lo largo de este capítulo, se pueden establecer otros modelos de relación entre el hombre y los microorganismos.

Aún hoy las enfermedades infecciosas siguen siendo una de las más frecuentes que afectan al ser humano, predominando en algunas zonas pobres del planeta, donde se presentan con una gran mortalidad. A pesar del avance producido en el conocimiento de la biología de los microorganismos, y del desarrollo de vacunas y antimicrobianos eficaces, su impacto en la morbilidad no ha disminuido como se esperaba a nivel mundial.

En las últimas décadas asistimos incluso a un aumento de las enfermedades infecciosas causadas por los llamados patógenos “oportunistas”, debido en parte a procedimientos médicos diagnósticos y/o terapéuticos (que alteran los mecanismos defensivos del huésped), y al uso indiscriminado de antimicrobianos.

Por otro lado debemos recordar que muchas enfermedades infecciosas como por ejemplo la gripe, son transmisibles, es decir que producen fenómenos poblacionales, desde casos aislados hasta epidemias o pandemias, debiendo considerar la triple relación huésped-parásito-ambiente para el adecuado control de las mismas.

Finalmente, existe una ecología de las enfermedades infecciosas. Las enfermedades vienen y van, dependiendo de factores ecológicos que incluyen los cambios causados por la actividad humana. Así, situaciones como las guerras, desnutrición, distribución desigual de los recursos económicos, el comercio internacional y movimiento turístico (ya que las enfermedades viajan de un país a otro acompañando a las personas o productos), han determinado en parte la reemergencia y emergencia de viejos y nuevos patógenos, respectivamente.

## CONCEPTOS Y DEFINICIONES

Los microorganismos se clasifican según su forma de vida, en dos grandes grupos, saprofitas o parásitos.

Las bacterias saprofitas son aquellas de vida libre, que se desarrollan sobre sustancia orgánica e inorgánica inanimada. Generalmente, son incapaces de desarrollarse sobre un organismo superior o de causar enfermedad, ya que no encuentran en éste condiciones adecuadas para sobrevivir y multiplicarse, salvo en algunas situaciones particulares.

Los parásitos en sentido amplio habitan otros seres vivos y llevan una vida en común. Clásicamente, se considera que un parásito puede comportarse como comensal, simbionte, o patógeno en su huésped.

La terminología utilizada históricamente para definir la interacción huésped-parásito (IHP), ha ido cambiando con el avance del conocimiento.

En un comienzo se consideraba que los microorganismos eran primariamente agresores que gobernaban la IHP, resultando en enfermedad.

Luego, nueva información sobre los atributos de virulencia microbianos, permitió comprender que no siempre la interacción resultaba en enfermedad, y que la patogenicidad no era una característica estable ni constante en los microorganismos.

Se comenzó a utilizar términos como comensal, portador y oportunitista, para definir a microorganismos y condiciones que a veces se asociaban con la enfermedad, pero que por alguna razón no cumplían completamente con los *postulados de Koch*, aquellos que determinan una relación causal entre los microorganismos y la enfermedad. Además, dicha relación causal no es firmemente establecida bajo los postulados originales, especialmente para aquellos agentes que no son cultivables en el laboratorio.

La tecnología de amplificación de DNA y la hibridación “*in situ*”, han ido suplementando y/o complementando en algunos casos los cultivos microbianos en las placas de Petri y las tinciones tradicionales, para “cultivar” y “observar” a algunos microorganismos. Dado que existen muchos enfoques actuales que incriminan a los genes y sus productos con la enfermedad infecciosa, se proponen nuevos postulados moleculares para probar la causalidad microbiana en la enfermedad (ver cuadro 6.1).

En los comienzos del siglo XX, la atenuación exitosa de algunos patógenos en el laboratorio, reveló que la virulencia se podía atenuar o incrementar a través del pasaje de los microorganismos en cultivos animales y/o “*in vitro*”, lo que llevó eventualmente al desarrollo de vacunas.

A nivel clínico, se reconoció que un microorganismo responsable de una enfermedad epidémica, podía aislarse tanto de un paciente sintomático como asintomático durante una epidemia, como era el caso de *Neisseria meningitidis* durante un brote de meningitis.

Intrínseco a los términos comensalismo, colonización y estado de portador, estaba el concepto de que algunos microbios tenían la capacidad de persistir en sus huéspedes.

Actualmente se propone que el resultado de la IHP, está determinada por la naturaleza del daño que resulta de esa relación (ver esquema 6.1). Este concepto se basa en tres supuestos. Primero, la adquisición de un microorganismo por un huésped puede resultar en alguna forma de daño tisular, que despierta una respuesta inmune específica. Segundo, excepto por la adquisición connatal de microorganismos, los

**Cuadro 6.1.****Postulados de KOCH, originales y actuales**

Postulados de KOCH		Problemas
1	La bacteria debe asociarse con la lesión, debe encontrarse en el individuo enfermo pero nunca en el individuo sano.	Algunas bacterias colonizan sin causar enfermedad sintomática.
2	La bacteria debe ser aislada en cultivo puro.	Algunas bacterias no pueden ser cultivadas.
3	La bacteria aislada debe producir enfermedad cuando es inoculada en un huésped humano o animal.	Es el postulado más difícil de satisfacer, cuando la enfermedad es demasiado grave como para utilizar voluntarios humanos o no existen modelos animales.
4	La bacteria debe ser re-aislada desde un animal o un humano infectado intencionalmente.	
5	Nuevo postulado propuesto: la información sobre un microorganismo debe permitir a los científicos, diseñar terapéuticas efectivas o medidas preventivas.	
Algunos postulados “moleculares” de KOCH		Problemas
Base genética molecular de la patogenicidad.		
1	La secuencia nucleotídica de un determinado patógeno debe estar presente en la mayoría de los casos de la enfermedad.	Una de las dificultades en la aplicación de una forma molecular de los postulados de Koch, es similar a un problema que enfrentó Koch en su propia época: el hallazgo de un sistema modelo apropiado en animales de laboratorio.
2	Pocas o ninguna copia del DNA de un patógeno debe encontrarse en tejidos o huéspedes sin enfermedad	
3	La inactivación específica del/los gen/ es asociados con el rasgo sospechoso de virulencia, debe conducir a una disminución mensurable en la virulencia.	

mamíferos nacen sin carga microbiana significativa, y la adquisición inicial de la flora resulta por la tanto de la infección. Tercero, el grado y tipo de daño que ocurre durante la IHP inicial y/o posterior, determina el resultado de dicha relación.

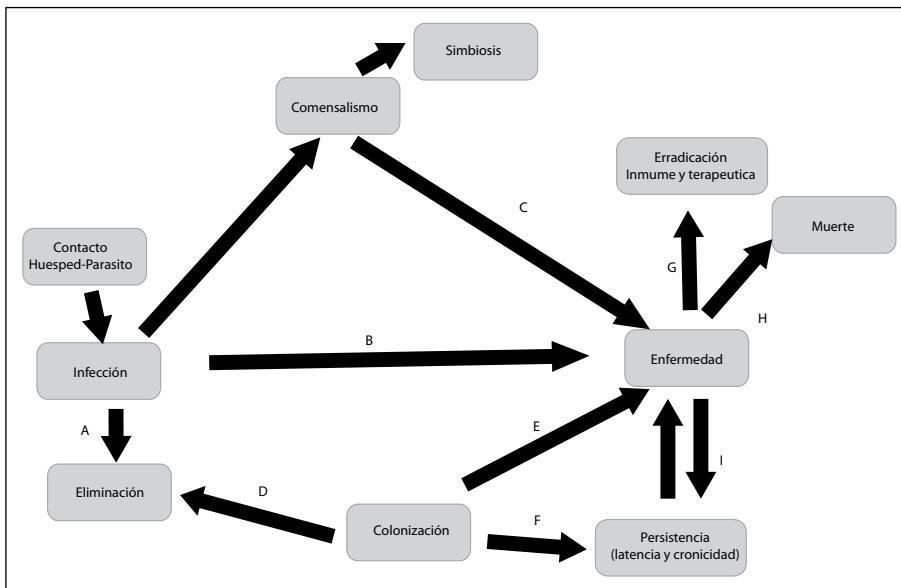
## INFECCIÓN

La palabra infección proviene del latín *infieri*, que significa ‘manchar’, ‘corromper’, y se ha asociado con la enfermedad desde la antigüedad.

Actualmente se propone definir a la infección como la adquisición de un microorganismo por un huésped. Su erradicación puede darse al primer contacto, por mecanismos no inmunes al inicio (por ejemplo mecánicos), y luego por medio de éstos. La respuesta inmune exitosa y/o el tratamiento antimicrobiano, reducen el daño continuo a niveles insignificantes. Notablemente, la erradicación de un microorganismo puede no eliminar la enfermedad, dado que el daño inmunológico puede persistir luego de una respuesta exitosa contra el patógeno, como en la fiebre reumática post estreptocócica.

### Esquema 6.1.

**Resultados de la Interacción Huésped-Parásito.** A-La adquisición de un microorganismo puede ser seguida de su eliminación a través de mecanismos inmunes o mecánicos. B-La adquisición de ciertos microbios puede resultar en daño y enfermedad en ciertos individuos. C-Ciertos microorganismos comensales pueden causar enfermedad si el estadio de comensalismo es alterado por defectos en la inmunidad, o alteraciones de la flora normal (ejemplo *Candida albicans* puede causar candidiasis faríngea o vaginal, en los estados de inmunosupresión o tras tratamiento antibiótico, respectivamente.). D-El estadio de colonización puede ser eliminado por la respuesta inmune (ejemplo portadores nasales transitorios de *Neisseria meningitidis* o *Streptococcus pneumoniae*). No se comprende bien cual es el disparador de la respuesta inmune, pero debe ocurrir luego de alcanzar el umbral de daño. E-La colonización puede llevar a la enfermedad si de la interacción se genera daño suficiente, el cual puede ser mediado por el huésped, el parásito o ambos. F-La colonización puede llevar a la persistencia (cronicidad y latencia), cuando la respuesta inmune no puede erradicar la infección a pesar del daño continuo (ejemplo tuberculosis latente). G-La respuesta inmune o la terapia pueden erradicar la infección pero no siempre terminar con la enfermedad, porque el daño puede ser irreversible (ejemplo poliomielitis), o continuar por algún mecanismo inmunológico (ejemplo reactivación de artropatías). H-Si se produce suficiente daño, puede ocurrir la muerte. I-Las infecciones persistentes pueden reactivarse y convertirse en enfermedad (ejemplo reactivación tuberculosa).



Además, el concepto de que la enfermedad clínica se asocia con el daño y la inducción de la respuesta inmune, es consistente con el paradigma corriente de que las células de sistema inmune, deben interactuar directamente con los microbios o sus antígenos, para producir una respuesta inmune específica.

### Comensalismo

La palabra comensal (del latín *com*: con, *mensa*: tabla y *al*: perteneciente a), se puede traducir como “comiendo en la misma mesa”. Se define como una IHP que no resulta en daño perceptible y/o persistente en el huésped. Sin embargo, esto puede no ser absoluto, ya que una adquisición inicial de un microorganismo comensal, puede despertar un daño en algunos huéspedes. Por ejemplo, *Escherichia coli* que se adquie-

re rápidamente luego del nacimiento, puede determinar cierto riesgo de meningitis durante el primer mes de vida de algunos infantes.

### Colonización, persistencia y enfermedad

La colonización se define como un estado en el que el microbio puede estar presente en el huésped, por un tiempo variable. Se caracteriza por la replicación microbiana que puede inducir un daño, y disparar una respuesta inmune específica, la cual puede erradicar o no al microbio. Si la respuesta inmune, la terapia antimicrobiana, y/o la vacunación logran erradicar al microorganismo, se elimina el estado de colonización.

En el caso donde el daño es insignificante, no se puede distinguir del comensalismo. Sin embargo el estadio de comensal, generalmente ocurre temprano en la vida de un individuo.

### Portadores asintomáticos

Son personas infectadas que no tienen síntomas, y configuran un grupo importante de individuos, porque son capaces de diseminar los microorganismos que ellos portan, a personas que pueden desarrollar la enfermedad (ver cuadro 6.2).

### Persistencia

Es el estado en el que no se logra eliminar al microorganismo, y el daño se asocia a períodos largos de colonización como lo es la formación de un granuloma, tras la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. El daño progresivo puede llevar a la enfermedad y la muerte.

En suma, podemos decir que la colonización y sus distintas versiones (persistencia y enfermedad), representan la presencia continua de un microorganismo en el huésped con un grado variable pero continuo de daño.

La latencia es sinónimo de persistencia, este término se usa habitualmente para describir las infecciones asintomáticas de larga data, pero que pueden hacerse sintomáticas.

El término enfermedad deriva del latín *infirmitat*: *in-*'no'; *firm-*'firme', 'fuerte'; *tāt* (*em*) lat: «no firme», «falto de firmeza». Significa alteración más o menos grave de la salud.

Se define enfermedad como las manifestaciones clínicas presentes que resultan del daño producido tras la IHP.

### Cuadro 6.2.

Ejemplo de portador asintomático.

<b>"MARY TYPHOID"</b>
Mary Mallon más conocida como Mary Typhoid, fue quizá la portadora de <i>Salmonella typhi</i> más famosa. Esta mujer trabajó como cocinera en Nueva York, entre 1896 y 1906, causando 28 casos de fiebre tifoidea en casas particulares, siendo por ello arrestada y admitida en un hospital de infecciosos de la ciudad, donde al ser estudiada se confirmó que eliminaba una gran cantidad de estas bacterias sin presentar síntomas. Al ser liberada luego de jurar no elaborar ni servir comida para otros, cambió su nombre y continuó cocinando. Por cinco años evitó ser capturada mientras diseminaba la enfermedad. Eventualmente fue capturada y encarcelada por 23 años hasta su muerte en 1938. Se considera que como portadora asintomática estuvo relacionada posiblemente con 10 brotes de fiebre tifoidea, 53 casos, y 3 muertes.

## PATOGENIA

Como ya comentamos, la patogenia microbiana refleja una IHP que esta determinada por múltiples factores: el estado inmune del huésped, la virulencia bacteriana, y el inóculo microbiano al que esta expuesto el huésped.

Es por ello que un número limitado de bacterias, es responsable de la mayoría de las enfermedades infecciosas en los individuos sanos, y que todos los individuos no responden igual frente a un microbio.

Generalmente, un gran inóculo determina una mayor enfermedad. Sin embargo, pocos microorganismos pueden causar enfermedad si son extremadamente virulentos (como lo es *Shigella*, una enterobacteria agente de diarrea), o si la resistencia del huésped es baja. Incluso puede presentarse una inmunodepresión tan severa, que la propia flora pueda causar enfermedad.

### Patógenos verdaderos y oportunistas.

Se considera una bacteria como “oportunista”, cuando no causa enfermedad en personas inmunocompetentes, pero sí pueden causarla cuando esas personas presentan una alteración de sus defensas. Por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, no infecta a menos que se den algunas condiciones que hagan al individuo más susceptible a la infección, como frente a quemaduras, heridas, o fibrosis quística. Se lo puede considerar como menos patógeno, pero los microorganismos oportunistas son de los más frecuentes como causa de muerte en los pacientes hospitalizados.

La línea entre la categoría de oportunista y la de agentes capaces de causar enfermedad en las personas sanas, los llamados patógenos “primarios” o “verdaderos”, es muy difícil de establecer. Por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae*, principal agente de neumonía bacteriana en la comunidad, se considera un patógeno primario; sin embargo, una persona con gripe es más susceptible de sobre-infectarse con este agente, por lo tanto en esta situación se podría considerar como oportunista.

Con respecto a los términos patogenicidad y virulencia, podemos decir que son similares. El primero se define como la capacidad y/o habilidad de un agente infeccioso para causar daño o producir enfermedad. La virulencia (del latín: *virulentia* de *virus*: veneno) en cambio, proporciona una medida cuantitativa de la patogenicidad, así por ejemplo, los neumococos capsulados son más virulentos que los no capsulados. Habitualmente, se mide de forma experimental determinando la dosis letal 50 ( $LD_{50}$ ), o la dosis infecciosa 50 ( $ID_{50}$ ). Estos valores se refieren a la dosis o número de bacterias que pueden matar o infectar respectivamente, al 50% de los huéspedes experimentales en determinado tiempo.

El potencial patogénico se refiere al grado de morbilidad que puede generar un patógeno, y un aspecto importante de éste es la toxigenicidad, habilidad patogénica de producir toxinas, y sustancias químicas que pueden dañar al huésped y producir enfermedad.

Un patógeno al que se le conoce su factor de virulencia mayor es *Vibrio cholerae*, agente del cólera, ya que produce los síntomas de la enfermedad por medio de la acción de la toxina colérica, que es claramente un factor de virulencia. Pero muchas veces es difícil determinar cuando un factor se considera de virulencia, o cuando hay más de un factor en juego.

Es importante destacar que la presencia de factores de virulencia en las bacterias patógenas, se asocia en un grado notable con la presencia de plásmidos, transposones,

y bacteriófagos, tanto en las especies Gram positivas como Gram negativas. Esto habla de un intercambio horizontal de genes asociado con la virulencia. Además, hoy se sabe que estos genes se encuentran agrupados en islas genómicas llamadas “islas de patogenicidad” (ver capítulo de genética bacteriana).

En definitiva, la evolución de una infección representa un continuo, y la ocurrencia de un estado u otro, es el resultado del juego entre factores del huésped y factores microbianos, de un microorganismo particular en un huésped particular.

Por lo tanto, ese complejo juego es el que permite a algunos microorganismos ser comensales en un huésped, pero causar enfermedad en otros. Por ello, los atributos de virulencia microbiana y la distinción entre patógeno y no patógeno, dependen críticamente de factores del huésped.

### **Determinantes de la enfermedad infecciosa**

El proceso infeccioso es complejo y requiere la acción coordinada de productos microbianos para que se produzca. Para inducir la enfermedad, el patógeno debe ser capaz de:

1. inicialmente ser transportado al huésped;
2. adherirse para colonizar o invadir al huésped;
3. multiplicarse (crecer) o completar su ciclo vital en el huésped;
4. eventualmente evadir los mecanismos de defensa del huésped;
5. poseer la habilidad mecánica, química o molecular para dañar al huésped;

### **TRANSMISIBILIDAD DE LOS AGENTES INFECCIOSOS**

Existe una epidemiología de las enfermedades transmisibles, siendo las vías de transmisión aquellas que permiten que los agentes lleguen al huésped susceptible. Éstas vías pueden ser la aérea; hídrica; vectorial (por artrópodos); contacto directo a través de fomites (objetos inanimados), persona a persona, animales; o indirecto a través de fluidos, sangre, etc.

Las bacterias transmisibles causan entonces infecciones exógenas, es decir que provienen del exterior. Como ya comentamos, las infecciones endógenas son causadas por bacterias que provienen del propio organismo, a partir de la flora normal o transitoria.

### **ADHERENCIA Y COLONIZACIÓN**

Luego de acceder a un huésped susceptible, el siguiente paso es la fijación o adherencia del microorganismo a las superficies celulares, y la colonización de los tejidos. Esta última depende de la habilidad del patógeno para competir eficazmente con la flora normal por nutrientes esenciales.

Estructuras especializadas que permiten al patógeno competir por sitios de adherencia superficiales, también son necesarias para la colonización. Los patógenos y no patógenos se adhieren con una alta especificidad a tejidos particulares. Una de las razones de tal especificidad son los factores de adherencia llamados adhesinas, moléculas o estructuras especializadas de las superficies microbianas, que se unen complementariamente a receptores ubicados en la superficie de la célula huésped.

### **ENTRADA DEL PATÓGENO**

La mayoría penetran activamente los epitelios una vez adheridos, lo cual puede ir

seguido de la producción de sustancias líticas que alteran los tejidos del huésped. Otras veces penetran pasivamente a través de macro y/o micro lesiones mucocutáneas, etc. Una vez en el epitelio puede continuar la diseminación, por medio de enzimas y productos específicos promotores de la misma, pudiendo a través de los vasos linfáticos y capilares alcanzar la circulación general, y así acceder a todos los órganos del cuerpo.

#### CRECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN MICROBIANA

Para crecer y reproducirse satisfactoriamente, un patógeno debe encontrar un entorno adecuado (nutrientes, pH, temperatura, potencial redox, etc.) en su huésped.

Finalmente, tiene lugar la producción del daño (alteraciones y lesiones en células y tejidos), local o sistémico. Este se puede generar por tres diferentes mecanismos:

1. acción directa por efecto citopático de los microorganismos intracelulares, o de las sustancias tóxicas que alteran la estructura o la función celular (endotoxinas y exotoxinas).
2. efecto indirecto como consecuencia del proceso inflamatorio reactivo o de la respuesta inmune, como son los fenómenos de hipersensibilidad ( fiebre reumática post estreptocócica, etc.)
3. efecto combinado, que es el más común.

Algunos patógenos invaden células específicas en las cuales crecen, y se multiplican (patógenos intracelulares), llegando incluso a ser considerados patógenos intracelulares obligados. El ejemplo más claro de esto son los virus.

Otros son patógenos intracelulares facultativos, como *Mycobacterium tuberculosis* (ver cuadro 6.3).

Las bacterias extracelulares pueden replicarse fuera de las células huésped, por ejemplo en la circulación, tejido conjuntivo, etc. Producen enfermedad por dos mecanismos principales, donde en el primero provocan una inflamación que conlleva a la destrucción del tejido en el foco de infección, como se da en los cocos Gram positivos piógenos (formadores de pus) como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, que causan un gran número de infecciones supuradas. Como segundo mecanismo producen toxinas con efectos patógenos diversos.

Las toxinas bacterianas se clasifican en dos tipos, exotoxinas si son secretadas de manera activa por la bacteria, endotoxinas y si son un componente de la pared celular de las bacterias Gram negativas (ver cuadro 6.4).

#### Cuadro 6.3.

##### Ejemplos de microorganismos patógenos

Microorganismo	Enfermedades
<b>Bacterias extracelulares</b>	
<i>Escherichia coli</i>	Infecciones urinarias, gastroenteritis, sepsis.
<i>Neisseria meningitidis</i>	Meningitis
<b>Bacterias intracelulares</b>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriosis
<i>Legionella pneumophila</i>	Enfermedad de los Legionarios
Mycobacterias	Tuberculosis, Lepra

**Cuadro 6.4.**

Características diferenciales entre exotoxinas y endotoxinas bacterianas

Características	Exotoxinas	Endotoxinas
Naturaleza química	Proteínas	Lipopolisacárido (LPS)
Toxicidad	Elevada	Menor
Acción	Específica	Inespecífica
Calor	Termolábil	Termoestable
Toxídeos	Sí	No
Poder inmunógeno	Elevado	Escaso
Neutralización por anticuerpos	Total	Parcial
Sueros antitóxicos	Sí	No
Bacterias productoras	Gram positivas y gram negativas	Gram negativas

**Cuadro 6.5.**

Clasificación de las exotoxinas bacterianas

Tipos	Denominación	Características	Ejemplos
I	Superantígenos	Se unen a su blanco en la superficie celular, no se translocan a la célula huésped	<i>Staphylococcus aureus</i> (TSST-1) <i>Streptococcus pyogenes</i> (Spe)
II	Citotoxinas formadoras de poros Fosfolipasas	Destruyen la integridad de las membranas de las células eucariotas	-α toxina de <i>Staphylococcus aureus</i> y de <i>Clostridium perfringens</i> -β toxina de <i>Staphylococcus aureus</i> (fosfolipasa C)
III	Tipo A-B La mayoría con actividad ADP ribosilasa	Porción B: se une a receptores de célula huésped. Porción A: se transloca al interior del citoplasma celular	Toxinas de <i>Clostridium tetani</i> y <i>Clostridium botulinum</i> . Toxina diftérica.

A su vez, las exotoxinas presentan una clasificación variada y compleja, por lo cual una de ellas se basa en su blanco de acción, por ejemplo neurotoxina, leucotoxina, hepatotoxina, cardiotoxina y otras; y una clasificación en base a las especies que las producen o las enfermedades que causan: toxina de cólera, de shiga, diftérica, botulínica, tetánica, etc. Según el tipo de actividad pueden ser adenilato ciclase, lecitinasa, etc.

Existe actualmente una clasificación basada en los mecanismos de acción, donde encontramos los tipo I, II y III de exotoxinas (ver cuadro 6.5).

En relación al proceso infeccioso, los factores de virulencia se pueden clasificar en dos grupos: aquellos que permiten colonizar e invadir, y los que le dan al microorganismo la capacidad de producir daño (ver cuadro 6.6).

**Patógenos emergentes y reemergentes.**

Como describímos al inicio del capítulo, nos enfrentamos al desafío actual de los llamados patógenos emergentes y reemergentes. Los primeros son aquellos que han

**Cuadro 6.6.**

Relación entre factores de virulencia y etapas de la infección

Etapas de la infección	Factores de virulencia	Ejemplos
Capacidad de colonización e invasión	Adherencia: fimbrias y adhesinas. Penetración: enzimas histolíticas. Diseminación. Adaptación y evasión de los mecanismos de defensa del huésped.	proteína F de <i>Streptococcus pyogenes</i> pili P de <i>Escherichia coli</i> colagenasa de <i>Clostridium perfringens</i> cápsula de <i>Streptococcus pneumoniae</i> proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i> sideróforo: <i>Aeromonas</i> (aerobactina)
Capacidad para producir daño	Local: enzimas histolíticas y toxinas de acción local. Sistémico: toxinas que actúa a distancia.	Exotoxinas: hialuronidasa de <i>Staphylococcus aureus</i> , toxina de <i>Vibrio cholerae</i> y <i>Corynebacterium diphtheriae</i> Endotoxinas: <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , etc.

aumentado su incidencia y prevalencia en las últimas tres décadas, como el VIH y el virus de la hepatitis C; y los segundos son los que han sido aparentemente erradicados o que habían disminuido su incidencia, como *Mycobacterium tuberculosis* y el virus dengue.

Esta situación refleja no solo la actividad humana, sino también la capacidad que poseen los microorganismos para adaptarse y sobrevivir a los diferentes entornos, gracias a su gran plasticidad genética y metabólica (pensar por ejemplo en los microorganismos multirresistentes). Se considera que tanto la virulencia como la resistencia antibiótica, son mecanismos similares de adaptación seleccionados para sobrevivir bajo ciertas condiciones de stress, sea ésta la invasión a un huésped, o el tratamiento antibiótico.

Finalmente, es importante reconocer que las IHP no siempre entran claramente en una de las categorías mencionadas. Por lo tanto la terminología utilizada para comprender la patogenia microbiana tiene sus limitaciones, y va cambiando a lo largo del tiempo a medida que se conoce más sobre la IHP, como se ha mostrado a lo largo del texto. Por ejemplo, hay quienes no consideran la resistencia bacteriana como un factor de virulencia, sin embargo la resistencia está íntimamente ligada con la habilidad de ciertas bacterias para causar infecciones letales.

Ahora pasaremos a desarrollar de forma detallada las características de la flora normal, dada la importancia del conocimiento de la misma en microbiología médica.

## FLORA NORMAL

El cuerpo humano presenta una gran superficie cutánea y mucosa, por la que están en contacto con el medio ambiente. En esta superficie existen diversos sectores con diferentes características de humedad, temperatura, pH y disponibilidad de nutrientes, en los cuales residen microorganismos

La flora humana normal, es el conjunto de microorganismos que conviven con el huésped en estado normal, sin causarle enfermedad. Su composición es característica para la especie humana, tanto en el tipo de microorganismos que la componen, como en su número y distribución en el organismo. La flora normal coloniza las superficies cutáneas y mucosas.

Sin embargo, hay que mencionar que en el organismo en condiciones normales existen sitios estériles, como la pleura, las meninges, la cavidad peritoneal, el pericardio, etc. Esto debe ser tenido en consideración al realizar un estudio microbiológico. Las técnicas usadas para obtener una muestra biológica de un sitio con flora normal, son diferentes a las usadas para sitios estériles. También son diferentes los medios de cultivo que se usarán para sembrar dichas muestras (generalmente requerirán medios que inhiban el crecimiento de la flora normal), y la interpretación de los cultivos. Por ejemplo, si se aísla un microorganismo del líquido cefalorraquídeo, siempre es anormal si se tomaron las precauciones necesarias para no contaminar la muestra; en cambio, en un exudado faríngeo se aislarán diferentes microorganismos, los cuales deberán ser valorados cuidadosamente para destacar los que son habitantes normales de ese sitio, y los que no.

La flora basal característica de cada sector del organismo, y está constituida por bacterias que siempre están presentes en dicho sitio. Por ejemplo *Staphylococcus epidermidis* en la piel, y *Escherichia coli* en el intestino. En cambio, la flora transitoria es variable de un ser humano a otro, y está compuesta por bacterias que colonizan en forma intermitente un determinado sector. Esta flora transitoria puede incluir bacterias potencialmente patógenas, para el individuo u otras personas que entran en contacto con él. Hay que destacar que la flora transitoria de la piel, puede ser eliminada con el lavado de manos.

### Importancia de la flora normal

La flora humana normal representa un importante mecanismo de defensa del huésped (ver cuadro 6.7). Contribuye al desarrollo de la respuesta inmunológica, como ha sido demostrado en modelos animales que nacen, y son criados en condiciones estériles (individuos axénicos). Estos animales presentan un pobre desarrollo de los componentes de su sistema inmunitario.

La flora normal, además, ayuda a evitar la colonización de la piel o las mucosas por bacterias que pueden ser patógenas.

Generalmente los microorganismos para iniciar la infección deben primero colonizar los epitelios. Allí, seguramente compiten con los integrantes de la flora normal, por factores tales como receptores celulares y nutrientes.

### Flora normal de la cavidad oral

Existen diversos nichos dentro de la cavidad oral, y pueden reconocerse diferencias en la com-

#### Cuadro 6.7.

##### Importancia de la flora normal

Efectos directos	Producción de bacteriocinas. Producción de metabolitos tóxicos. Reducción del potencial de óxido reducción. Consumo de nutrientes esenciales. Competencia por receptores.
Efectos indirectos	Aumento de la producción de anticuerpos. Estímulo de la fagocitosis. Aumento de la producción de interferón. Deconjugación de ácidos biliares

posición si se estudia la flora de los dientes, la lengua, la mucosa yugal, o el surco periodontal. La flora oral es de tipo mixto, con asociación de bacterias aerobias y anaerobias.

Las bacterias que se adhieren a la superficie dental en forma permanente, lo hacen por diferentes polímeros de origen bacteriano como dextranos y levanos, sintetizados a partir de hidratos de carbono de la dieta. La cantidad de bacterias anaerobias es máxima en el surco gingival. Los dientes presentan superficies de adherencia que tienen la particularidad de no renovarse periódicamente, como lo hacen los epitelios.

Formando parte de esta flora predominan diferentes especies de *Streptococcus*  $\alpha$ -hemolíticos. A nivel de la placa dentaria se hallan *Streptococcus mutans*, y *Streptococcus sanguis*. *Streptococcus mitis* se adhiere tanto a los dientes como a las mucosas, y *Streptococcus salivarius* predomina en la mucosa lingual. El frotis realizado de saliva o hisopados de mucosa oral, muestran células epiteliales y cocos Gram positivos en cadenas. Esto suele verse en muestras de expectoración mal recogidas, e indican contaminación por flora oral.

Entre las bacterias anaerobias Gram positivas pueden hallarse *Actinomyces* spp. en la placa dentaria y algunas especies de *Lactobacillus* en menor cantidad. La mayoría de las Gram negativas son anaerobias como *Bacteroides* del grupo *melaninogenicus*, y especies del género *Fusobacterium*. También pueden encontrarse espiroquetas del género *Treponema* distintas de *Treponema pallidum*. Los cocos Gram positivos anaerobios pertenecen a los géneros *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* y *Ruminococcus* entre otros. Además pueden aislarse especies de *Mycoplasmas* y levaduras del género *Candida*.

Como es un complejo ecosistema, existen muchas interrelaciones complejas también entre los distintos integrantes. En la placa dentaria, las bacterias se hallan en altas concentraciones, formando colonias microscópicas y ubicándose en estratos. La flora de la cavidad oral está involucrada en la patogenia de enfermedades como las caries y la periodontitis. En el desarrollo de la caries dental intervienen no solo las bacterias, sino también factores como el pH ácido resultante de la descomposición de hidratos de carbono de la dieta, etc. La periodontitis resulta de la agresión de la flora normal a los tejidos de sostén del diente. Los microorganismos de la boca también causan procesos como los abscesos periodontales y de cuello.

Los pacientes con válvulas cardíacas enfermas, pueden desarrollar endocarditis bacteriana, en la que están implicados los *Streptococcus*  $\alpha$ -hemolíticos. Esta enfermedad generalmente es una infección endógena causada por bacterias de la cavidad oral, que pasan al torrente sanguíneo por manipulaciones odontológicas, y colonizan las válvulas cardíacas alteradas.

La actinomicosis cervicofacial, es una enfermedad que tiene como agente etiológico algunas especies de *Actinomyces* provenientes de la cavidad oral.

### **Flora normal del aparato digestivo**

El tubo digestivo alberga un gran número de bacterias. También en este nivel se pueden reconocer distintos nichos ecológicos. La flora normal intestinal contribuye a la síntesis de vitaminas K y de vitaminas del complejo B, además de ayudar en los procesos digestivos. También compiten con los microorganismos patógenos por los nutrientes y los receptores, y elaboran bacteriocinas.

#### **ESTÓMAGO**

En condiciones fisiológicas y sin alimentos, el pH gástrico es extremadamente ácido, aproximadamente con un valor de 2. Con los alimentos éste aumenta aproximándose a pH neutro.

La densidad de bacterias en el estómago es relativamente baja, y se compone de microorga-

nismos de la flora orofaríngea que han sido deglutidos, como *Streptococcus*  $\alpha$ -hemolíticos, *Lactobacillus* spp., los cocos anaerobios, *Candida* spp., y otros capaces de resistir el medio ácido.

### INTESTINO DELGADO

En el duodeno se mantiene el pH que limita el crecimiento de microorganismos. El peristaltismo representa un mecanismo importante que mantiene un número bajo de bacterias.

Por otro lado, la bilis tiene propiedades antimicrobianas que inhibe a muchos microorganismos.

Otras sustancias, como la lisozima y la inmunoglobulina A (IgA) secretoria, también contribuyen a mantener un número reducido de bacterias.

La cantidad de bacterias aumenta gradualmente hacia el íleon. En los sectores distales del intestino delgado, la flora normal se asemeja a la flora colónica. En el íleon terminal se alcanzan concentraciones de  $10^6$  a  $10^8$  bacterias por ml de contenido intestinal, con predominio de anaerobios.

### INTESTINO GRUESO

Las bacterias representan aproximadamente el 40% del peso seco de la materia fecal. El aumento del contenido bacteriano probablemente se explica por disminución del peristaltismo, aumento del pH cercano al fisiológico, y disminución del contenido de agua.

Pasando la válvula ileocecal, los microorganismos de la flora normal alcanzan concentraciones de  $10^7$  a  $10^9$  bacterias por ml, llegando al máximo en el recto con  $10^{11}$  bacterias por ml.

Sin duda, es el mayor y más complejo ecosistema microbiano del organismo, y se estima que en él conviven más de 500 especies diferentes de bacterias, con predominio de las bacterias anaerobias. Estos corresponden en su mayoría a los géneros *Bacteroides* y *Fusobacterium* entre los bacilos Gram negativos, y especies de *Peptostreptococcus*, *Sarcina* y *Veillonella* entre los cocos. Los bacilos Gram positivos están representados por especies de *Bifidobacterium*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Clostridium*. Entre los anaerobios facultativos predominan las enterobacterias, siendo *Escherichia coli* la que predomina, seguida de especies de *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter* y *Citrobacter*. Entre los cocos Gram positivos pueden hallarse especies de *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*.

La adquisición de la flora normal se inicia en el momento del nacimiento; en el recién nacido los microorganismos que inicialmente colonizan el aparato digestivo provienen del periné y de la vagina de la madre. Generalmente se trata de *E. coli*, *Klebsiella* spp., especies de *Enterococcus*; y más raramente especies de *Clostridium*.

En lactantes alimentados a pecho se aíslan *Bifidobacterium* spp. Con la introducción de la alimentación artificial aumenta el número y la diversidad de los microorganismos normales del intestino. Al año de vida la flora digestiva normal es idéntica a la del adulto.

La importancia que tiene la flora normal del intestino se basa en lo siguiente. En primer lugar, es de destacar que determina el desarrollo correcto de la mucosa intestinal; además interviene en el metabolismo de sustancias como el ácido fólico, la biotina, y las vitaminas B<sub>12</sub>, K y E. También favorece la producción de IgA y contribuye a la immunotolerancia, dado que constituye un importante estímulo antigénico. Las bacterias que forman la flora normal del intestino cumplen un rol importante en la constitución del ciclo enterohepático de algunos fármacos. También tiene efecto de barrera, porque al ocupar nichos ecológicos impide el establecimiento de otras bacterias potencialmente patógenas. Este fenómeno se conoce como interferencia bacteriana. Las bacteriocinas son sustancias segregadas por las bacterias normales del intestino; dichos productos son tóxicos para bacterias de otros géneros distintos a los normales. Por último cabe mencionar que la flora normal del aparato digestivo,

interviene en infecciones oportunistas o endógenas en circunstancias como: obstrucciones mecánicas y perforación del aparato digestivo. En este caso, los microorganismos pasan al peritoneo causando una enfermedad grave.

La gran diversidad de la flora fecal puede ser fácilmente objetivada, realizando un frotis de materia fecal normal, tñiéndolo con coloración de Gram, y observándolo al microscopio. Se observarán muchas bacterias Gram positivas y Gram negativas, tanto bacilos como cocos.

### **Flora normal de la vagina**

La flora normal de la vagina fue una de las primeras en ser reconocida en 1892 por Döderlein, quien describió el patrón biológico normal que se observa en la mujer en edad genital activa. La composición de la flora normal depende del contenido estrogénico.

El estímulo hormonal determina la proliferación de las células epiteliales, que aumentan su contenido de glucógeno. Este es utilizado por *Lactobacillus* spp., siendo el ácido láctico el producto final del metabolismo, el cual provoca un descenso importante del pH. La acidez resultante inhibe el crecimiento de muchas bacterias. En la mujer en edad genital activa predominan distintas especies de *Lactobacillus*, otros bacilos Gram positivos, y en menor cantidad cocos Gram positivos (*Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., etc.). También pueden encontrarse algunos *Actinomyces*, bacilos Gram negativos anaerobios como *Bacteroides*, y distintas especies de enterobacterias. *Streptococcus agalactiae* (grupo B) se aísla en un porcentaje variable a esta edad, que aunque no suele producir enfermedad en la mujer, su presencia implica riesgo para el recién nacido en el que puede causar una enfermedad severa.

Durante la gestación, a medida que progresa el embarazo, aumenta la densidad de *Lactobacillus* y disminuye la de bacilos Gram negativos anaerobios y facultativos; el resultado es un mecanismo que reduce el riesgo de bacteriemia grave durante el parto y el puerperio.

Algunas levaduras como *Candida albicans* y otras, pueden formar parte de la flora vaginal normal. Estos hongos eventualmente, por alteraciones del ecosistema pueden causar síntomas.

En la etapa prepuberal predominan los microorganismos de origen cutáneo y perineal: *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium* spp., y pueden aislarse levaduras en escaso número, al igual que enterobacterias y bacilos Gram negativos anaerobios.

En la mujer postmenopáusica, gracias al cese del estímulo hormonal, la flora de la vagina retorna al patrón que tenía en la infancia.

La flora vaginal protege frente a la infección vaginal especialmente durante el embarazo, y suministra la flora normal al recién nacido.

El exudado vaginal es el estudio bacteriológico indicado para el diagnóstico de la infección genital, y comprende el estudio directo y cultivos de los fluidos vaginales. En la mujer sana en edad genital activa, el examen directo mostrará células epiteliales planas acompañadas de *Lactobacillus*: bacilos Gram positivos grandes. En condiciones patológicas esta imagen se pierde, y es reemplazada por la presencia de polimorfonucleares, levaduras con pseudofilamentos, *Gardnerella vaginalis*, flora de tipo anaerobia, etc.

### **Flora normal del aparato respiratorio**

El aparato respiratorio se divide en dos sectores anatómicos: alto y bajo. En el individuo normal únicamente las vías respiratorias altas (fosas nasales y faringe) están colonizados por flora normal. Los senos paranasales, el oído medio, la tráquea, los bronquios pulmonares y la pleura son estériles.

En las fosas nasales la estructura anatómica tortuosa genera una corriente de aire

turbulenta. Cuando el aire choca contra las mucosas, se calienta, y las partículas grandes que éste contiene son retenidas por el mucus y los pelos de las narinas. En sectores más bajos los microorganismos que ingresan por esta vía, llegan al tejido linfoide del anillo de Waldeyer.

El sistema mucociliar, la capa de moco y los reflejos como la tos, el estornudo y la broncoconstricción, son otros mecanismos de defensa importantes. La mucosa respiratoria también es rica en IgA.

En el tejido pulmonar existen macrófagos alveolares que contribuyen a la defensa del huésped, fagocitando las bacterias y otras partículas.

En la faringe la flora normal está compuesta principalmente por *Streptococcus*  $\alpha$ -hemolíticos. El estudio bacteriológico de un hisopado faringoamigdalino, es habitualmente indicado para diagnosticar faringitis bacteriana. Una vez realizado el cultivo en placas de agar sangre ovina, el bacteriólogo debe ser capaz de diferenciar la flora normal, compuesta principalmente por *Streptococcus viridans*, de potenciales patógenos como *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos.

En las fosas nasales se encuentran microorganismos característicos de la piel: *Staphylococcus epidermidis* y especies de *Corynebacterium*. Alrededor de 20 a 30% de los individuos son portadores nasales sanos de *Staphylococcus aureus*, porcentaje que aumenta en personas diabéticas sometidas a hemodiálisis, y en el personal de salud. En preescolares es habitual la colonización nasal por *Streptococcus pneumoniae* y especies de *Haemophilus*.

En la faringe se encuentran además diferentes especies de *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Monaxella*, etc. Los anaerobios superan en diez veces a los aerobios y se aíslan *Peptostreptococcus* spp., *Bifidobacterium* spp. y *Actinomyces* spp. Los bacilos Gram negativos que se encuentran, generalmente son *Fusobacterium* spp. y *Bacteroides* spp.

En las criptas amigdalinas se produce acumulación de materia orgánica que disminuye el potencial de óxido reducción, por lo tanto el número de anaerobios puede ser muy elevado. Algunos individuos albergan *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, sin que ello signifique enfermedad. También pueden encontrarse especies no patógenas de *Neisseria* y *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos no pertenecientes al grupo A. En condiciones normales no existen bacterias más allá de la glotis.

La flora orofaríngea está implicada en infecciones pulmonares, causadas por la aspiración de estos microorganismos. Generalmente esto ocurre en pacientes que tienen alterados los reflejos de defensa debido a alteraciones de la conciencia, etc. En las infecciones bronquiales o pulmonares, el estudio de la expectoración puede resultar útil si el paciente logra obtener una buena muestra mediante el esfuerzo de tos. Hay que ser cauteloso en la lectura de esta muestra, porque la misma se contaminará en diferentes grados por la flora oral. Como ya se dijo, si se observa al microscopio, se podrá diferenciar una muestra inapropiada formada principalmente por saliva, de una muestra adecuada, compuesta principalmente por leucocitos polimorfonucleares y escasas o ninguna célula epitelial

### **Flora normal de la piel**

La piel del ser humano es un extenso y heterogéneo territorio con diferencias en su estructura y condiciones ambientales, lo que determina diferencias en la densidad y composición de su flora normal, según el área considerada. La mayoría de los microorganismos colonizan el estrato córneo, que es relativamente impermeable.

Los mecanismos de defensa que presenta la piel están representados por el recambio celular continuo de las capas superficiales del epitelio, el pH bajo debido a metabolitos de las glándulas sebáceas, y los macrófagos de la piel.

Como se mencionó, en el personal hospitalario la flora transitoria puede estar inte-

grada por bacterias que potencialmente pueden causar enfermedad a los pacientes. El lavado de manos es la medida profiláctica más importante para evitar la transmisión de infecciones.

La composición de la flora normal, tanto en sus aspectos cualitativos como cuantitativos, puede estar influida por factores climáticos, condiciones de higiene, etc. Dentro de los microorganismos que constituyen la flora normal de la piel, predominan los Gram positivos. La flora basal se compone de *Staphylococcus* spp. (generalmente *Staphylococcus epidermidis*), *Micrococcus* spp. y *Corynebacterium* spp. *Propionibacterium acnes* es un bacilo Gram positivo anaerobio que coloniza las glándulas sebáceas. Esta bacteria posee lipasas que degradan los lípidos secretados por esas bacterias. Los metabolitos resultantes son principalmente ácidos grasos insaturados con actividad antimicrobiana. La flora transitoria está integrada por *Staphylococcus aureus* y en menor cantidad, por bacilos Gram negativos (Enterobacterias, *Acinetobacter*) en regiones como axilas, ingle y periné.

Esta flora cutánea participa en el desarrollo de infecciones cuando se producen soluciones de continuidad en la piel. Muchas infecciones como foliculitis o forunculosis tienen origen en los folículos pilosos o glándulas. Otras infecciones ocasionadas por bacterias de la flora normal, se producen cuando se colocan catéteres percutáneos u otros dispositivos que implican la ruptura de la barrera cutánea.

La flora del conducto auditivo externo es similar a la de la piel. Hay que destacar que a diferencia del oído externo, el oído medio es estéril.

La flora normal de la piel puede objetivarse mediante cultivos en medios apropiados.

### **Flora normal de la conjuntiva**

La conjuntiva ocular carece de flora basal, porque no se producen interacciones estables entre esta mucosa y los microorganismos.

El saco conjuntival puede contener algunos microorganismos que proceden de la piel circundante o del contacto mano ojo. La secreción lacrimal efectúa un continuo barrido de las partículas que se depositan en la conjuntiva. Esta secreción es rica en lisozima, enzima que destruye las bacterias, especialmente las Gram positivas. El parpadeo, las pestañas y las cejas, contribuyen a evitar el ingreso de partículas al saco conjuntival.

Las bacterias que pueden encontrarse son *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Streptococcus*  $\alpha$ -hemolíticos y *Bacillus* spp. El uso de lentes de contacto se asocia a la colonización por bacterias de los géneros *Serratia* y *Pseudomonas*.

Las bacterias de la conjuntiva pueden causar infecciones graves como úlceras de córnea y endoftalmitis. Éstas, generalmente están precedidas por traumatismos de córnea o perforaciones del globo ocular.

### **Flora normal del aparato urinario**

Excepto la uretra anterior, el aparato urinario es estéril. La orina contribuye a mantener la vía urinaria libre de microorganismos, gracias al arrastre de la orina durante la micción, al pH ácido de la orina, y a la alta osmolaridad que presenta.

La uretra anterior está colonizada por bacterias provenientes del periné. Dichas bacterias son eliminadas al inicio de la micción, propiedad que se usa para obtener la muestra por chorro medio para el urocultivo, evitando así la contaminación.

En la mujer, la menor longitud de la uretra y la proximidad de ésta con el ano, explican al menos en parte, la mayor incidencia de infección urinaria.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bacterial pathogenesis. A molecular approach. Chapter 2. Approaching and Studying bacterial diseases. Salyers A.A. and Whitt D.D. 2th Edition. ASM Press, Washington, DC, USA. 2002.
- Bacterial pathogenesis. A molecular approach. Chapter 9. Bacterial exotoxins: Important but still a mystery. Salyers A.A. and Whitt D.D. 2th Edition. ASM Press, Washington, DC, USA.2002.
- Casadevall A, Pirofski L.A. Host-Pathogen Interactions: Basic Concepts of Microbial Commensalism, Colonization, Infection, and Disease. *Infect Immun* 2000; 68: 6511-6518.
- Fredericks D, Relman D. Secuence-Based Identification of Microbial Pathogens: a Reconsideration of Koch´s Postulates. *Clinical Microbiol Rev*. 1996; 9: 18-33.
- García-Rodríguez J.A., Picazo JJ. Microbiología Médica. Parte 1. Microbiología Médica General. Tema 7: Relación huésped-bacteria Mosby/Doyma Libros SA. Madrid, España. 1996. Pág.111-120.



# Inmunidad contra los agentes infecciosos

*A. Rial, M. Pereira, J. Chabalgoity*

## INTRODUCCIÓN

A lo largo de su vida, un individuo está expuesto a muchos agentes infecciosos; sin embargo, en la mayoría de las situaciones la enfermedad es la excepción más que la regla.

La mayoría de los microorganismos infecciosos no logran ingresar al individuo, gracias a las barreras físicas y químicas que éste presenta. La barrera física más importante es la piel; la integridad de ésta, junto a la secreción de mediadores químicos, evita el ingreso de microorganismos patógenos. Asimismo, las mucosas poseen una serie de atributos (secreciones, flujo ciliar) que dificultan el ingreso de microorganismos por esa vía. Además, la existencia de poblaciones microbianas no patógenas residentes (flora normal), también impide la colonización de las mucosas por agentes infecciosos.

La mayoría de los microorganismos que logran evadir estas barreras y producir infección, son destruidos en pocas horas por mecanismos no específicos de inducción rápida (inmunidad innata). Sin embargo, si un agente infeccioso es capaz de superar esas primeras líneas de defensa, se activará en la mayoría de los casos, un tipo de respuesta de defensa (inmunidad adaptativa), altamente especializada y específica. Ésta logrará, en la mayoría de las situaciones, controlar la infección y suprimir la enfermedad. Además, de este proceso resultará la generación de memoria inmunológica, que permitirá al individuo en el próximo contacto con el mismo agente, responder más rápida y efectivamente.

La importancia fundamental que tiene el sistema inmune en la sobrevida de los individuos, está evidenciada por las enfermedades que padecen los individuos con alguna disfunción de este sistema. Por otro lado, la correcta regulación de la homeostasis del sistema inmune es central, porque la exacerbación de la respuesta puede provocar enfermedad en el individuo. Así, la inmunopatología es una consecuencia frecuente de la respuesta inmune contra muchos agentes infecciosos.

En este capítulo describiremos en términos generales, las características centrales de la respuesta inmune innata y adaptativa, analizando las características fundamentales de la respuesta inmune desarrollada contra distintos tipos de microorganismos.

La inmunología como ciencia ha tenido gran desarrollo, y existen excelentes libros

de texto básicos en esta materia que deberían ser consultados para un conocimiento más detallado.

## INMUNIDAD INNATA E INMUNIDAD ADAPTATIVA

Una respuesta inmune efectiva del hospedero frente a organismos extraños, requiere de la acción coordinada y conjunta del sistema inmune innato y adaptativo. Durante muchos años se estudiaron ambas formas de inmunidad, como entidades separadas que actuaban en forma secuencial. Sin embargo, hoy es claro que ambos mecanismos son parte de un único sistema integrado.

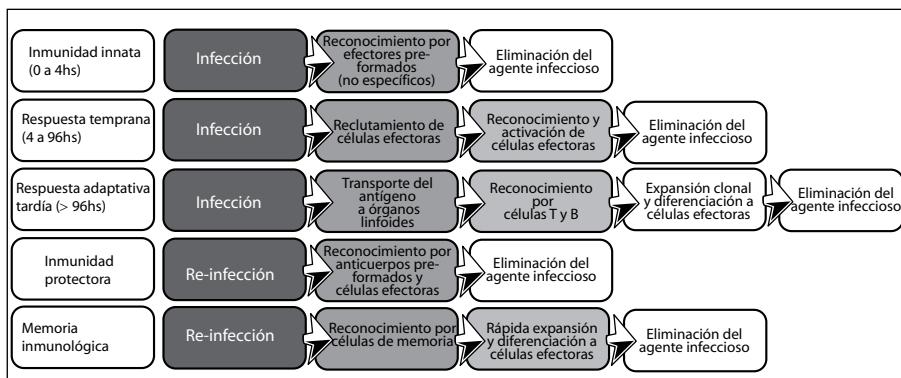
La respuesta inmune innata brinda la primera línea de defensa contra los microorganismos invasores, pero además provee el contexto biológico, y las señales que instruirán al sistema inmune adaptativo para montar su respuesta. Así, los eventos ocurridos en el contexto de la inmunidad innata, determinan el perfil del tipo de respuesta adaptativa que se desarrollará contra el agente patógeno. Asimismo la respuesta inmune adaptativa, recurre a mecanismos efectores y mediadores característicos de la inmunidad innata, para eliminar a los microorganismos patógenos. (Figura 7.1).

### Inmunidad innata

El objetivo de la inmunidad innata es evitar la instalación del proceso infeccioso; si éste se produce, colabora en el establecimiento de un ambiente apropiado para que se desarrolle posteriormente una respuesta adaptativa. Los mecanismos efectores de defensa de la inmunidad innata están compuestos por células que cumplen funciones defensivas (fagocitosis, citotoxicidad), y factores solubles (citoquinas y quemoquinas, interferones, complemento), que controlan y destruyen los microorganismos que ingresan. Dentro de las principales células fagocíticas del sistema inmune innato se encuentran los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares, mientras que las células asesinas naturales (“natural killer”), son las principales células innatas con capacidad citotóxica.

Estos mecanismos si bien son generales y durante mucho tiempo se los consideró inespecíficos, hoy se sabe que incluyen mecanismos de reconocimiento específico acoplados a sistemas de señalización intracelular, que permiten identificar el tipo de agente patógeno que está ingresando al organismo. Ello permite activar una respuesta

**Figura 7.1.**



rápida y efectiva contra ese microorganismo, además de definir el perfil de respuesta inmune adaptativa que se generará contra el agente patógeno, si éste logra sobrepasar la primera línea de defensa.

#### LOS FAGOCITOS POSEEN RECEPTORES QUE RECONOCEN COMPONENTES MICROBIANOS (FIGURA 7.2)

El reconocimiento de los microorganismos por el sistema inmune innato, está determinado por receptores conocidos como “*Pattern Recognition Receptors*” (PRRs) que reconocen patrones moleculares conservados: “*Pathogen Associated Molecular Patterns*” (PAMP), compartidos por grandes grupos de microorganismos. Como ejemplos de esos patrones asociados a patogenicidad cabe mencionar el lipopolisacárido (LPS) en bacterias Gram negativas, los peptidoglicanos de la pared de bacterias Gram positivas, o la flagelina, componente estructural del flagelo bacteriano. Igualmente el DNA bacteriano presenta motivos CpG no metilados que también constituyen un PAMP.

Existen receptores de superficie en células del hospedero, que reconocen estos patrones y activan vías de señalización celular, que iniciarán una serie de eventos coordinados en la inmunidad innata; como ejemplos podemos citar los receptores de residuos de manosa, de glicanos y los “*Scavenger receptors*”.

Otro grupo muy importante de PRRs son los llamados “*Toll Like Receptors*” (TLRs); son una familia de receptores conservados en términos evolutivos, altamente especializados en traducir señales. Son esenciales para traducir el reconocimiento de componentes microbianos en activación del sistema inmune. En la actualidad hay ya descritos más de 10 TLRs diferentes, que interactúan con una gran cantidad de PAMPs, como LPS (TLR-4), flagelina (TLR 5), o motivos CpG bacterianos o virales (TLR-9) (ver figura 7.1). Un elemento en común de todos los TLRs es que se trata de receptores de membrana. Existen otros PRRs de ubicación citosólica, como los receptores Nod también involucrados en la inducción de señales, que llevarán a la activación de una respuesta inmune, en particular contra patógenos intracelulares.

Los macrófagos tisulares residentes junto con las células dendríticas (DCs), tienen un rol crítico en el inicio de la respuesta inmune innata en el tejido. Ambos tipos celulares expresan diversos PRRs, y la activación de éstos por PAMPs derivados de los patógenos, induce la liberación de mediadores inflamatorios, fundamentalmente de citoquinas y quemoquinas.

#### LAS QUEMOQUINAS CONECTAN LA INMUNIDAD INNATA CON LA ADAPTATIVA

Los eventos mediados por TLRs son esenciales, tanto para el reclutamiento de DCs a los sitios de entrada de patógenos, como para la posterior migración de estas células a los nódulos linfáticos regionales para dar inicio al desarrollo de la respuesta inmune adaptativa.. Las quemoquinas liberadas por células, residentes en el sitio de infección activadas, guiarán las células T activadas desde el ganglio linfático hacia el sitio de entrada o de replicación del microorganismo. Por lo tanto, las quemoquinas son un factor central que une eventos de la inmunidad innata y adaptativa. Estas sustancias pueden dividirse en inflamatorias y constitutivas. Las quemoquinas inflamatorias son inducidas o reguladas positivamente por estímulos inflamatorios (LPS, peptidoglicanos, ácidos teicoicos, motivos CpG) y son responsables del reclutamiento de células inflamatorias. Como ejemplo de éstas citamos: interleuquina 8 (IL-8 o CXCL8), MIP-1 $\alpha$  (CCL3), MIP-1 $\beta$  (CCL4), RANTES (CCL5), exotaxina (CCL11), MCP-1



Figura 7.2.

(CCL2), e IP-10 (CXCL10). Las quemoquinas constitutivas (CCL17, CCL19, CCL21) están presentes solo en médula ósea, timo y órganos linfoides secundarios. Son las responsables del control homeostático de los leucocitos, y de dirigir el encuentro de las células que necesitan interaccionar para generar una respuesta inmune: DCs maduras provenientes de tejidos periféricos, y células T y B vírgenes.

En suma, la discriminación de los microorganismos a través de los TLRs y otros PRRs, y la consecuente producción de un conjunto determinado de quemoquinas, delimita el tipo de respuesta inducida contra agentes patógenos específicos. Es decir, los microorganismos determinan la naturaleza de la respuesta inmune por la activación diferencial de TLRs, y los patrones de expresión de quemoquinas que determinarán los tipos celulares reclutados.

#### IMPORTANCIA DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA

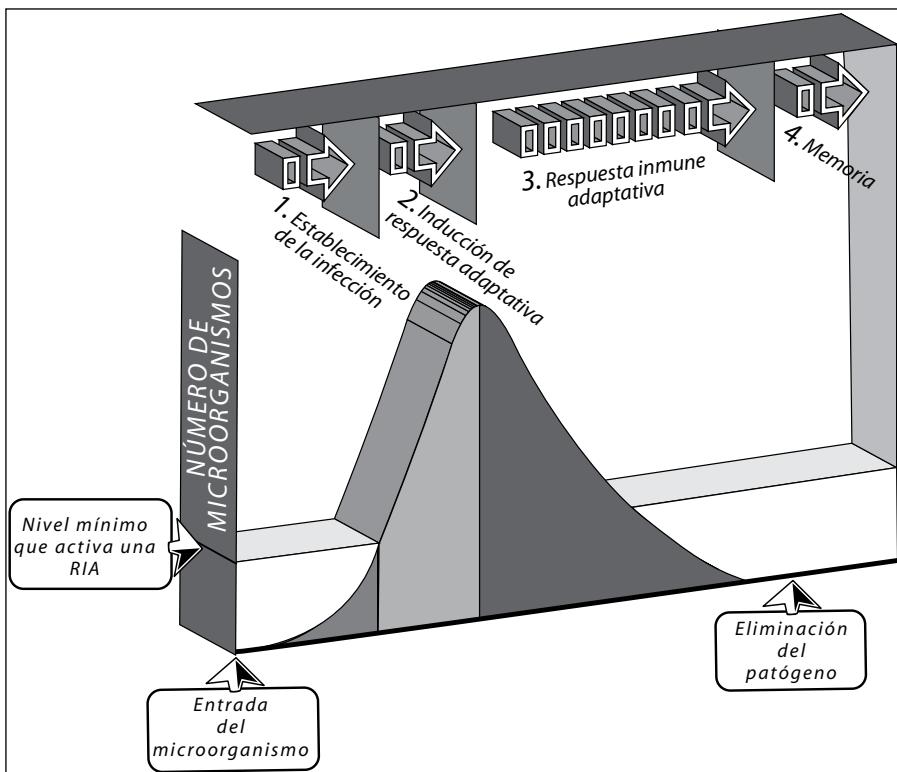
Durante muchos años se ha acumulado información de la importancia de la respuesta inmune adaptativa, evaluando fundamentalmente las enfermedades asociadas a las deficiencias de los componentes de la misma. Se conocía mucho menos sobre la importancia de la respuesta inmune innata, porque las deficiencias de ésta son muy raras. Hoy día, la posibilidad de contar con animales transgénicos deficientes en distintos PRRs permite evaluar en su justa dimensión el rol central de la respuesta inmune innata, en la protección contra agentes infecciosos.

#### Inmunidad adaptativa

Cuando un microorganismo logra evadir los mecanismos de la respuesta inmune innata, y se acumula en el individuo una cantidad de antígeno mayor a un umbral determinado, se activarán los mecanismos de la inmunidad adaptativa. Dicho proceso provocará la activación de las células con alta especificidad por el microorganismo en cuestión, y de mecanismos efectores que se activarán en forma específica contra el agente patógeno. Esta respuesta demora varios días en activarse, y está mediada por linfocitos T y B específicos para el microorganismo, que se activan y proliferan induciendo mecanismos efectores que eliminan el agente infeccioso, y generan memoria inmunológica (figura 7.3).

La respuesta inmune adaptativa se inicia en los ganglios linfáticos que drenan el sitio de infección, donde ocurre la interacción entre los linfocitos T y B vírgenes, específicos para los antígenos del patógeno, y las células dendríticas maduras provenientes del sitio de infección. Las DCs tienen un rol central en el desarrollo de la respuesta inmune, en tanto son las únicas Células Presentadoras de Antígeno (APC) con capacidad de activar linfocitos T vírgenes. Constituyen una población de células muy heterogénea, habiéndose identificado varias sub poblaciones tanto en humanos como en ratón. Sin embargo, todas derivan de un precursor CD34+ de médula ósea. Son células con alta capacidad migratoria, que circulan entre la sangre, los tejidos periféricos, la linfa y los órganos linfáticos. Las DCs circulan en la sangre como precursores hasta que ingresan a un tejido determinado, en el cual se transforman en DCs inmaduras (iDCs) residentes. Su rol principal en los tejidos y en las mucosas es capturar antígenos del microambiente, para después migrar hacia los ganglios linfáticos regionales, y presentar los péptidos antigenicos procesados a las células T. Las DCs, no solo son fundamentales en la generación de una respuesta inmune adaptativa, sino que también cumplen un rol fundamental en los procesos de regulación de na-

Figura 7.3.



turaleza cualitativa de esa respuesta, así como en la inducción de tolerancia inmune ante antígenos inocuos. Por todo esto, este tipo celular es actualmente considerado clave en la regulación de la homeostasis del sistema inmune.

Las DCs activadas estimulan en forma eficiente a los linfocitos T vírgenes, ya que expresan las señales de coestimulación que éstos necesitan para poder activarse, y diferenciarse a linfocitos con funciones efectoras. Los linfocitos T, activados en el ganglio, pueden o bien abandonar el ganglio y migrar hacia el sitio de inflamación (dirigidos por quemoquinas) para llevar adelante su actividad efectora, o bien pueden permanecer en el órgano linfático y participar en la inmunidad humoral, colaborando en la activación de linfocitos B específicos por el antígeno. El tipo de respuesta que se genere estará determinada en gran parte, por el ambiente de citoquinas generadas desde la inmunidad innata y durante la presentación antigénica; esto determinará la expansión de sub poblaciones específicas de células T. Dependiendo de que tipo de células T se expandan, será el tipo de inmunidad y los mecanismos efectores que se activarán.

En términos generales, la inmunidad adaptativa puede ser dividida en dos tipos de respuesta mediadas por diferentes componentes del sistema inmune, y cada una especializada en la eliminación de determinados tipos de patógenos: inmunidad humoral e inmunidad mediada por células o celular.

La inmunidad humoral está mediada por anticuerpos, moléculas presentes en las sangre y en secreciones mucosas, producidos por linfocitos B. Los anticuerpos reconocen antígenos microbianos (proteicos, lipídicos, glucídicos), neutralizan la infectividad de los microorganismos, y los “marcan” u opsonizan para que puedan ser eliminados por otros mecanismos efectores (por ejemplo macrófagos, neutrófilos). Hay distintos tipos de anticuerpos (IgG, IgM, IgA, IgE) los cuales a su vez son capaces de activar distintos tipos de mecanismos efectores para eliminar al microorganismo. Esta eliminación, generalmente, requiere de la interacción entre los anticuerpos y otros componentes del sistema inmune innato como son las moléculas del complemento, y células tales como los fagocitos y eosinófilos. Las funciones efectoras mediadas por anticuerpos incluyen la neutralización del microorganismo o de sus toxinas, activación del sistema complemento, y opsonización de antígenos de modo que puedan ser más eficientemente fagocitados (por ejemplo IgG). Además, presentan citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), en la cual los anticuerpos marcan al microorganismo o antígenos del mismo expresados por células del hospedero, para que ser eliminadas por células del sistema inmune innato. Por último, tienen como función la hipersensibilidad inmediata en donde los anticuerpos disparan la activación de los mastocitos (IgE). Asimismo, dentro de un mismo tipo o clase de anticuerpos como las IgG, se han definido diferentes subclases (en humanos IgG1, IgG2, IgG3), que también se asocian a tipos de respuesta distintos.

La inmunidad celular está mediada por linfocitos T. Los microorganismos intracelulares, como los virus y algunas bacterias, sobreviven y proliferan dentro de los fagocitos y otras células del hospedador, donde quedan inaccesibles a los anticuerpos circulantes. En estos casos, la inmunidad celular dispone de mecanismos efectores capaces de eliminarlos, por ejemplo a través de células con capacidad de matar a las células infectadas (linfocitos T citotóxicos, Tc), o activando a los fagocitos para que puedan eliminar al patógeno residente dentro de ellos, a través de la secreción de citoquinas por los linfocitos T colaboradores (T helper o Th).

Los linfocitos T citotóxicos expresan la molécula CD8 en su superficie (por tanto se reconocen como T CD8<sup>+</sup>), y sólo reconocen antígenos expresados en la superficie de otras células, en el contexto del MHC de clase I, el cual puede ser expresado por todas las células del hospedero. La función efectora de los Tc activados, es eliminar por citotoxicidad a aquellas células que sean reconocidas en este contexto. Por otro lado, los linfocitos T colaboradores, se caracterizan por la expresión de la molécula CD4 en su superficie (T CD4<sup>+</sup>), y reconocen antígenos expresados en el contexto del MHC de clase II. Las moléculas MHC de clase II sólo son expresadas por células presentadoras de antígeno (células dendríticas, células B, macrófagos).

La función efectora de las células Th está mediada por la producción de citoquinas. En función del tipo de citoquinas que produce, las células Th pueden ser divididas, a su vez, en Th1, Th2 y Th17. Las células Th1 activadas se caracterizan por la activación del factor de transcripción T-bet, a través de la señalización por STAT-4, y por la producción de IFN- $\gamma$ . Esta citoquina tiene la función esencial de activar mecanismos microbicidas en los macrófagos, que podrán eliminar más eficientemente los patógenos. Las células Th2 se caracterizan por la activación del factor de transcripción GATA3 a través de la señalización por STAT-6, y por la producción de IL-4 que se asocia a la activación de ciertas isotipos de inmunoglobulinas como IgE, y de ciertas subclases de IgG (IgG2a en ratón). Este tipo de respuesta está asociada a las respuestas alérgicas y

participa en la respuesta contra ciertos patógenos como los parásitos helmintos. Más recientemente se ha descrito una tercera población de células T colaboradoras, las células Th17, cuyo **fenotipo distintivo es la producción de IL-17**. El desarrollo de una población Th17 requiere de TGF- $\beta$  e IL-6, así como la **activación de los factores de transcripción ROR $\gamma$ t**, vía STAT3, y señales inducidas por citoquinas distintas, e incluso antagónicas a las requeridas para el desarrollo de respuestas Th1 ó Th2. Si bien en sus inicios las respuestas Th17 se asociaron fundamentalmente con procesos autoinmunes, existen cada vez mas evidencias que sugieren un rol relevante de IL-17 en inmunoprotección frente a patógenos extracelulares (bacterias y hongos), y más recientemente también frente a bacterias intracelulares.

Por último, existe otro gran grupo de células T CD4 $^{+}$ , que cumplen funciones reguladoras y que se denominan T reguladores (Tr1, Th3, Treg naturales). En términos generales, se puede decir que sólo expresan determinadas citoquinas (IL-10 o TGF- $\beta$ ), y que se caracterizan por la expresión del factor de transcripción Foxp3. Su función efectora es la de regular la respuesta inmune y mantener la homeostasis del hospedero.

## RESPUESTA INMUNE CONTRA MICROORGANISMOS

Las respuestas inmunes contra los microorganismos, aunque múltiples y variadas, presentan algunas características generales. La primera es que la defensa efectiva contra los microorganismos está mediada por mecanismos efectores, tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa. Muchos microorganismos han desarrollado mecanismos que les permiten sobrevivir a la respuesta inmune innata, y la protección contra ellos requiere de la participación activa de la inmunidad adaptativa. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el tipo de respuesta adaptativa está determinada en gran parte por eventos ocurridos durante la respuesta innata. Los agentes infecciosos pueden diferir mucho en sus patrones de invasión y de colonización, así como en la inmunogenicidad de sus antígenos. Por lo tanto, una respuesta inmune efectiva contra microorganismos distintos, puede requerir la activación de distintos tipos de mecanismos efectores, tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa.

La supervivencia y la patogenicidad de los microorganismos en el hospedero, está críticamente influenciada por su capacidad de evadir o resistir la inmunidad protectora, para lo cual ellos han desarrollado diferentes estrategias.

Otra característica en común es que en muchas infecciones el daño tisular y la enfermedad producida, puede ser causada por la propia respuesta inmune del hospedero contra el patógeno, más que por el microorganismo en sí mismo.

### Inmunidad frente a bacterias extracelulares

Las bacterias extracelulares se replican fuera de las células del hospedero, ya sea en la circulación sanguínea, en el tejido conectivo o en espacios tisulares como las vías aéreas o el lumen intestinal. En términos generales se podría decir que pueden causar enfermedad por dos mecanismos distintos. El primero es la inflamación que provoca destrucción de los tejidos en el sitio de infección. Como ejemplo de esto citamos las infecciones supuradas producidas por *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus* spp.

El segundo mecanismo es la producción de toxinas con distintos efectos nocivos. La endotoxina de las bacterias Gram negativas es un potente estimulador de la pro-

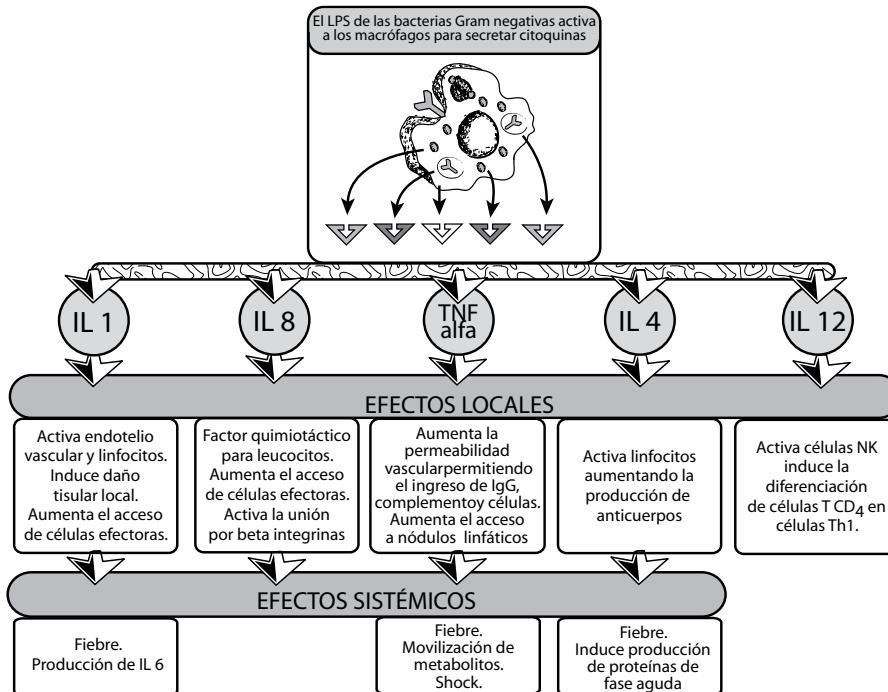
ducción de citoquinas y activador de los macrófagos. Muchas exotoxinas son primariamente citotóxicas, pudiendo matar por distintos mecanismos a las células a las que se fijan. Otras interfieren con las funciones celulares esenciales, por ejemplo la toxina diftérica inhibe la síntesis proteica bloqueando la función del factor de elongación 2, necesario para la síntesis de todos los polipéptidos. Otro ejemplo serían algunas toxinas clostridiales como las producidas por *Clostridium perfringens* histotóxico, que provocan una extensa necrosis de los tejidos, desarrollando gangrena gaseosa.

### INMUNIDAD INNATA

Los mecanismos fundamentales de la inmunidad innata operantes contra bacterias extracelulares son la fagocitosis, la respuesta inflamatoria inducida y la activación del complemento.

Los fagocitos interaccionan con las bacterias extracelulares mediante una serie de receptores (PRRs); dicha interacción, junto con la señalización intracelular realizada por los TLRs, activa los fagocitos incrementando su capacidad fagocítica y microbicida. De ahí que la resistencia de las bacterias a la fagocitosis y a la digestión dentro de los macrófagos, es un determinante importante de la patogenicidad y virulencia de las mismas. La activación de los fagocitos también provoca la secreción de quemoquinas y citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), y las interleuquinas IL-1, IL-6 e IL-8. Estos que inducen la adhesión de neutrófilos y monocitos al endotelio vascular en el sitio de la infección, seguida por la migración, acumulación local y activación de las células inflamatorias que eliminan las bacterias (ver figura 7.4). Sin embargo, la producción de grandes cantidades de citoquinas puede

**Figura 7.4.**



ser perjudicial, y de hecho son responsables de algunas manifestaciones clínicas de las infecciones por bacterias extracelulares. El daño de tejidos normales adyacentes es un efecto colateral de estos mecanismos de defensa. La consecuencia más grave inducida por la secreción descontrolada de citoquinas, es el *shock séptico* que puede presentarse con coagulación intravascular diseminada, falla multiorgánica y muerte. Esto es propio de algunas infecciones por bacterias Gram negativas (desencadenado por el LPS), y Gram positivas donde el peptidoglicano y los ácidos teicoicos desencadenan efectos similares.

La activación del complemento en ausencia de anticuerpos, también tiene un rol importante en la eliminación de estas bacterias. El peptidoglicano de las paredes celulares de las bacterias Gram positivas y el LPS de las paredes celulares Gram negativas, activan la vía alterna del complemento promoviendo la formación de C3 convertasa. Las bacterias que expresan manosa en su superficie, pueden unir una lectina (MBL) homóloga a C1q, que activa el sistema de complemento por la vía de las lectinas. Como resultado de la activación de este sistema, se genera C3b que opsoniza a las bacterias y mejora su fagocitosis. Además, la activación de la cascada del complemento podría terminar en la formación de un complejo de ataque a membranas que lisa a las bacterias.

#### INMUNIDAD ADAPTATIVA

La inmunidad humoral es la principal respuesta específica protectora contra estas bacterias. Los polisacáridos de las paredes celulares y de las cápsulas de estos microorganismos constituyen uno de los componentes más inmunogénicos de las mismas. Dichos antígenos estimulan a las células B, que generan una respuesta de inmunoglobulina (Ig) M específica, aunque también pueden generarse otros isotipos de Ig (IgG por ejemplo). Probablemente sea la liberación de citoquinas la que promueva el cambio de isotipos de cadena pesada de la Ig.

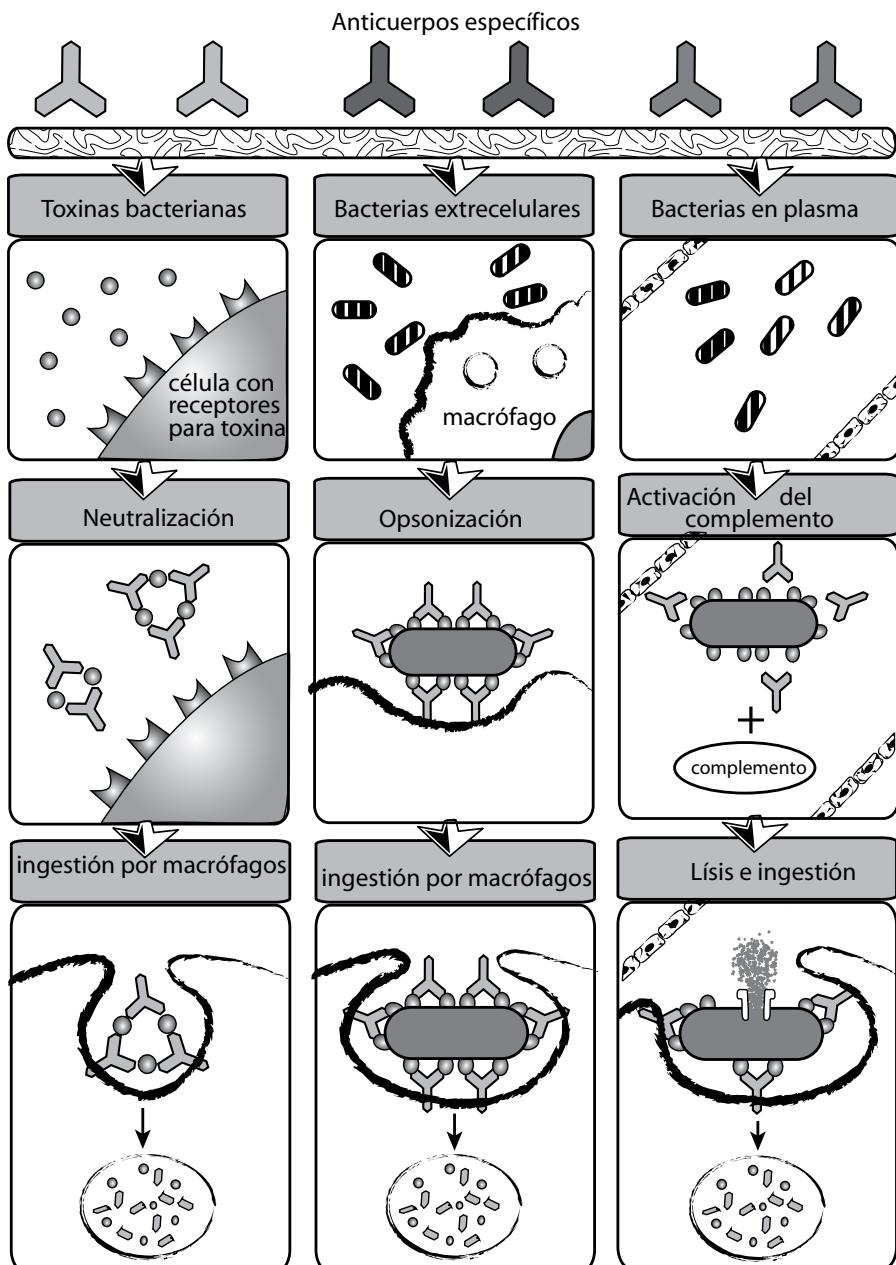
Los anticuerpos producidos contra los antígenos de superficie (polisacáridicos o proteicos), y las toxinas bacterianas, estimulan tres tipos de mecanismos efectores (ver figura 7.5):

1. Las IgG opsonizan a las bacterias favoreciendo la fagocitosis; éstas se unen a los receptores Fc y presentes en los monocitos, macrófagos y neutrófilos.
2. Las IgG e IgM neutralizan las toxinas bacterianas impidiendo que se unan a sus células blanco, promoviendo su eliminación por fagocitosis. Por ejemplo, la inmunización pasiva con anticuerpos dirigidos contra la toxina tetánica, es un tratamiento que podría salvar la vida del paciente en una infección aguda por *Clostridium tetani*.

En la mucosa respiratoria y gastrointestinal, la IgA secretoria tiene un rol importante en la neutralización de toxinas y en la prevención de la colonización de dichos tejidos.

3. Tanto la IgG como la IgM activan la vía clásica del sistema del complemento, que conduce a la formación, en la superficie bacteriana, de un complejo de ataque a membrana (MAC), cuya función lítica es importante sólo para eliminar algunos microorganismos. Los individuos con deficiencia en los componentes tardíos del complemento (C5 a C9), involucrados en la formación del MAC, tienen mayor sensibilidad a la infección por determinados microorganismos como especies de *Neisseria*; aunque no a otras infecciones bacterianas.

Figura 7.5.



La principal respuesta de las células T frente a las bacterias extracelulares, está mediada por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> que fueron activados por los antígenos bacterianos, presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II. Estos linfocitos actuarán como células T *helper* secretando citoquinas que estimulan la producción de anticuerpos específicos, y activando las funciones fagocíticas y

microbicidas de los macrófagos. Algunas toxinas bacterianas (superantígenos), pueden estimular inespecíficamente a las células T, y en consecuencia se liberan grandes cantidades de citoquinas y mediadores inflamatorios que finalizan con la producción del síndrome de *shock* tóxico. Como ejemplo de estos superantígenos mencionamos: la toxina del síndrome del *shock* tóxico de *Staphylococcus aureus* (TSST), y la exotoxina pirógena de *Streptococcus pyogenes*.

La inflamación aguda y el *shock* (tóxico o séptico) son dos consecuencias nocivas de la defensa contra las bacterias extracelulares. Una complicación tardía de las respuestas inmunes humorales frente a infecciones bacterianas, puede ser debida a la producción de anticuerpos productores de enfermedad. Son ejemplos conocidos de este fenómeno las enfermedades postestreptocócicas, que pueden darse como secuelas de infecciones producidas por *S. pyogenes* (fiebre reumática y glomerulonefritis difusa aguda).

#### EVASIÓN DE MECANISMOS INMUNES POR BACTERIAS EXTRACELULARES

La virulencia o patogenicidad de estas bacterias se relaciona con atributos que favorecen la colonización e invasión de los tejidos del hospedero, y que les permiten resistir a la acción del sistema inmune. Éstos incluyen: proteínas de superficie bacteriana con propiedades de adhesinas, mecanismos antifagocitarios e inhibición del complemento o inactivación de sus productos. Por ejemplo, algunos microorganismos como *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*, secretan proteasas de IgA (anticuerpo presente en las mucosas que colonizan); *S. pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*, presentan proteasas de C5a (derivado de la activación del sistema del complemento).

Las cápsulas de muchas bacterias Gram positivas y Gram negativas, confieren resistencia a la fagocitosis; además algunas tienen residuos de ácido siálico que inhiben la activación de la vía alterna del complemento. Por lo tanto, la producción de cápsula constituye un mecanismo importante de evasión inmune, y las bacterias encapsuladas son más virulentas que cepas carentes de cápsula.

Muchas bacterias que causan meningitis (*N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*) son capsuladas. Las cápsulas constituyen un elemento común y esencial de estas bacterias, que les permite sobrevivir en la sangre. Después de una fase de bacteriemia en la cual las bacterias evaden la fagocitosis y resisten la acción bactericida del complemento, llegan al espacio subaracnoideo y se multiplican activamente, en un ambiente donde los mecanismos de defensa son inefectivos. El hospedero tiene algunos mecanismos para oponerse al efecto antifagocítico de las cápsulas bacterianas; pero éstos sólo son efectivos luego del desarrollo de anticuerpos anticapsulares específicos que opsonizan al microorganismo para mejorar la fagocitosis y activar al complemento. En el individuo no inmunizado, mientras se desarrolla una respuesta adecuada de anticuerpos específicos, la bacteria puede multiplicarse en la sangre e invadir las meninges causando una meningitis aguda supurada. Por lo antedicho es que las vacunas desarrolladas contra estos microorganismos tienen antígenos capsulares de la bacteria como componente principal.

Otro mecanismo usado por las bacterias para evadir la respuesta inmune adaptativa, es la variación genética de antígenos de superficie. Muchas bacterias como *Escherichia coli* y *N. gonorrhoeae*, presentan pili, estructuras implicadas en la adhesión bacteriana a las células del hospedero, constituidos por la proteína pilina. En las *N. gonorrhoeae*, los genes que codifican la pilina consisten en uno o dos loci de expresión,

y diez a veinte loci silenciosos, cada uno conteniendo seis secuencias codificantes llamadas *minicassettes*. La variación antigenica de la proteína pilina resulta de una alta tasa de conversión entre loci silenciosos y de expresión. Así, es posible crear más de  $10^6$  combinaciones cuyos productos proteicos son antigenicamente distintos. Este mecanismo de variación antigenica ayuda a la bacteria a “escapar” de los anticuerpos específicos, aunque el significado principal para el microorganismo sea seleccionar el pili que mejor se adhiera a las células epiteliales del huésped.

### **Inmunidad frente a bacterias intracelulares**

Algunas bacterias son capaces de sobrevivir y replicarse dentro de células del hospedero. Ciertas bacterias patógenas como *Mycobacterium* y *Listeria monocytogenes*, son capaces de sobrevivir y multiplicarse aún dentro de los fagocitos. Como estas bacterias están en un nicho inaccesible a los anticuerpos circulantes, su eliminación requiere mecanismos inmunes distintos a los ya vistos para las bacterias extracelulares.

#### **INMUNIDAD INNATA**

Los mecanismos centrales de la inmunidad innata frente a estas bacterias son la fagocitosis, y la acción de células *natural killer* (NK). Sin embargo, las bacterias intracelulares son resistentes a la degradación dentro de los fagocitos mononucleares. Dicha resistencia contribuye en gran medida a que algunos patógenos intracelulares como *Mycobacterium Tuberculosis*, sean capaces de permanecer por largos períodos en el hospedero, recidivar luego de curas aparentes y establecer infecciones crónicas de difícil erradicación.

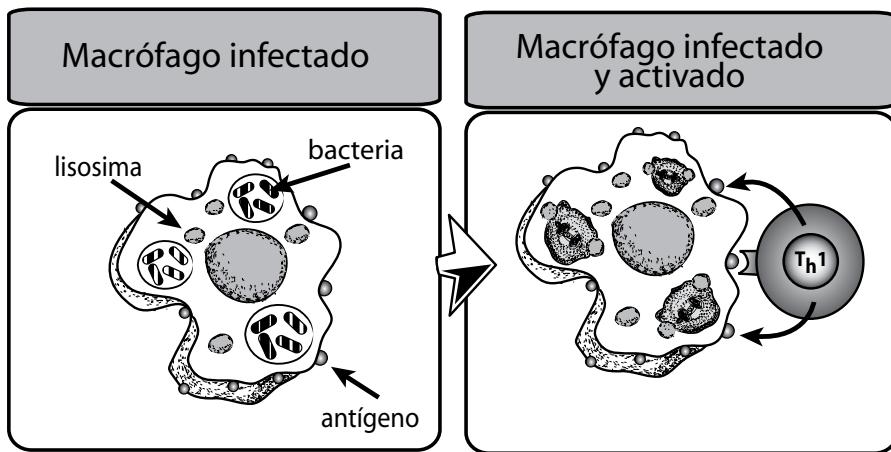
Por otro lado, las bacterias intracelulares inducen la activación de células NK, ya sea directamente o mediante la producción de citoquinas (específicamente interleuquina 12 o IL-12) derivadas de macrófagos. Las células NK activadas secretan interferón (IFN- $\gamma$ ), que es a su vez un potente activador de los macrófagos, mejorando su capacidad fagocítica y microbicida. Este proceso podrá retrasar el crecimiento de la bacteria; sin embargo, la resolución definitiva de la infección requiere de la inmunidad adaptativa. En tal sentido, se considera que las células NK son las células claves para la contención de las bacterias intracelulares mientras se desarrolla la inmunidad adaptativa.

#### **INMUNIDAD ADAPTATIVA**

La principal respuesta inmune protectora contra las bacterias intracelulares es la inmunidad mediada por células. Muchos抗genos proteicos de estas bacterias estimulan las respuestas de células T CD4 $^{+}$  y CD8 $^{+}$ , y ambos tipos celulares contribuyen al desarrollo de inmunidad protectora contra las bacterias intracelulares. Una función efectora central para eliminar estos microorganismos, es mediada por macrófagos activados por citoquinas (particularmente IFN- $\gamma$ ), derivadas de células Th<sub>1</sub> activadas (ver figura 7.6). Por otro lado, las células T CD8 $^{+}$  activadas, ejercen un efecto citotóxico sobre células infectadas, que presentan抗genos bacterianos en el contexto de MHC clase I.

Como ya se mencionó, estas bacterias han desarrollado mecanismos que las hacen resistentes a la fagocitosis, y que persisten por largos períodos aún en individuos con inmunidad celular efectiva. Dicha persistencia genera una estimulación antigenica crónica, que puede conducir a la formación de colecciones locales de macrófagos activados (granulomas), que rodean los microorganismos impidiendo su diseminación.

Figura 7.6.



La inflamación granulomatosa es una característica histológica propia de muchas infecciones producidas por micobacterias, y que se asocia con necrosis y fibrosis, conduciendo a lesiones funcionales severas. Así, la respuesta inmune del hospedero es la causa principal de la lesión tisular y la enfermedad en muchas infecciones por bacterias intracelulares como las micobacterias.

La respuesta inmune montada frente a este tipo de infecciones puede variar entre los individuos, siendo determinante de la progresión de la enfermedad y del pronóstico clínico.

#### EVASIÓN DE MECANISMOS INMUNES POR BACTERIAS INTRACELULARES

La mayoría de las bacterias se inactivan cuando son fagocitadas por macrófagos y leucocitos polimorfonucleares. Sin embargo, muchos microorganismos han desarrollado estrategias para sobrevivir y replicarse en estas células. Algunos usan los mecanismos fagocíticos preexistentes para su internalización, como *Mycobacterium spp.* y *Legionella pneumophila*, que se unen a fragmentos C3b del complemento lo que favorecen su captación por las células fagocíticas.

Una vez dentro de la vacuola fagocítica, algunos patógenos disuelven la membrana vacuolar y acceden al citoplasma celular rico en nutrientes, evadiendo los mecanismos bactericidas del fagocito; por ejemplo *Shigella flexneri*, algunas *Rickettsias* y *Legionella monocytogenes*; Ésta última produce una hemolisina (listeriolisina O) que forma poros en la membrana del fagosoma. Otros microorganismos como *Mycobacterium* y *Legionella*, son capaces de inhibir la actividad bactericida de los fagocitos impidiendo la fusión del fagolisosoma (impiden la acidificación del fagosoma), y algunos como *Coxiella burnetii* sobreviven a los agentes bactericidas liberados en el fagolisosoma (incluso requieren de factores allí presentes como señales que disparan su multiplicación intracelular).

Los principales factores de virulencia bacterianos que permiten resistir la fagocitosis y facilitan la sobrevida intracelular, incluyen las cápsulas y la producción de enzimas que destruyen la membrana vacuolar, que degradan proteínas lisosómicas, o que neutralizan los radicales tóxicos del oxígeno.

## Inmunidad frente a los virus

Los virus son microorganismos intracelulares obligados, que generalmente ingresan a las células susceptibles usando como receptores las moléculas normales de superficie celular. Por ejemplo el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se absorbe a la célula por medio de una glicoproteína de la envoltura viral (Gp 120), que se une al receptor CD4 de superficie. En este proceso también participan como coreceptores otras moléculas de superficie celular, como el receptor de quemoquinas CCR5. Los rinovirus (virus causante del resfrió común), se unen a moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1) expresadas en las células de muchos tejidos como las del epitelio respiratorio.

Cuando el virus está dentro de la célula huésped, causa lesión celular por diferentes mecanismos. La replicación viral puede interferir con la síntesis proteica celular y provocar la muerte de la célula por lisis, liberándose muchas partículas virales nuevas (virus citolíticos). Otros virus pueden causar infecciones latentes y permanecer quiescentes por largos períodos de tiempo, sin conducir a la muerte inmediata de la célula huésped.

La inmunidad contra los virus debe ser capaz de actuar en las distintas poblaciones de células infectadas (dado que distintos virus infectan distintas células). Dicho mecanismo inmunitario opera a dos niveles: previo a la invasión celular, en la etapa inicial de la infección y después de la invasión, cuando los virus son inaccesibles a los anticuerpos y fagocitos.

### INMUNIDAD INNATA

En primer lugar, la infección viral estimula la producción por parte de las células infectadas, de interferones (IFN) de tipo 1 (que comprende interferones  $\alpha$  y  $\beta$ ). Los IFN de tipo 1 tienen muchas acciones biológicas. Por un lado inhiben la replicación viral, estimulando la síntesis de enzimas celulares que interfieren con la replicación del ácido ribonucleico (RNA) o desoxirribonucleico (DNA) viral. Su acción antiviral también es ejercida sobre las células vecinas no infectadas, que quedan así protegidas de la infección. Por otro lado también inhiben la proliferación celular por inducción de las mismas enzimas mencionadas anteriormente, y de otras que actúan inhibiendo la síntesis de aminoácidos. También aumenta el potencial lítico de las células NK cuya función principal es matar las células infectadas por virus. Por último, modula la expresión de moléculas MHC, aumentando la expresión de las moléculas MHC clase I e inhibiendo las de clase II. Así mejora la eficiencia de los linfocitos T citotóxicos que reconocen antígenos extraños asociados a moléculas MHC de clase I.

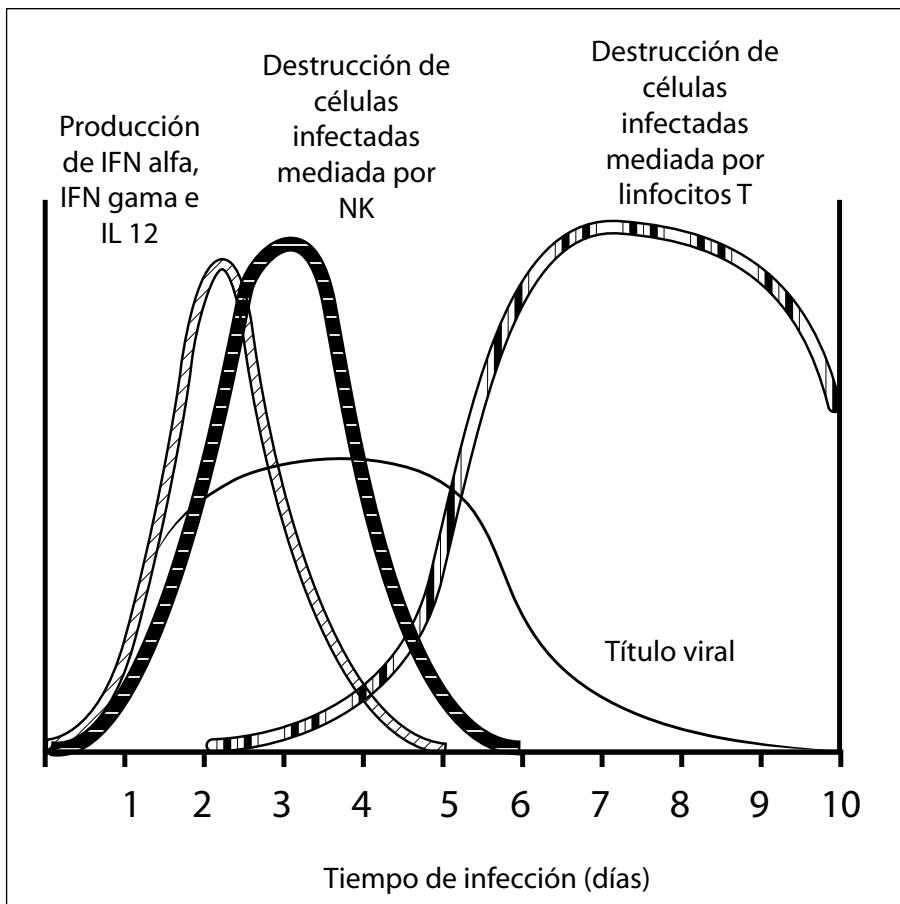
En segundo lugar, las células NK lisan muchas células infectadas por virus, constituyendo uno de los mecanismos efectores principales en los estadios iniciales de la infección viral (ver figura 7.7). Además de IFN tipo 1, otras citoquinas como IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2, aumentan el potencial lítico de estas células.

### INMUNIDAD ADAPTATIVA

La inmunidad específica contra virus está mediada tanto por mecanismos celulares como humorales.

En las etapas iniciales de la infección, los anticuerpos específicos antivirales son muy importantes. Los dirigidos contra las proteínas de envoltura o de las cápsides virales que participan en la adsorción, impiden la unión con el receptor celular y por lo

Figura 7.7.



tanto el ingreso a la célula susceptible; éstos son llamados anticuerpos neutralizantes. Además, opsonizan a los virus, de modo que pueden ser más fácilmente fagocitados. Sin embargo, los anticuerpos también pueden facilitar la infección de aquellas células portadoras de receptores Fc. La IgA de las mucosas es importante en la neutralización de virus que ingresan al organismo por vía respiratoria o digestiva; de hecho la inducción de inmunidad secretoria es una de las bases para el desarrollo de vacunas orales o nasales. Desafortunadamente, la vacuna oral contra la poliomielitis es una de las pocas que lo ha logrado.

Los anticuerpos también pueden colaborar activando al sistema complemento (vía clásica), lo cual puede terminar en la lisis de partículas virales envueltas (mediante la formación del MAC), o en la opsonización y eliminación por fagocitosis. Por último, los anticuerpos también pueden colaborar en la destrucción de células infectadas por virus, mediante el mecanismo de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC).

La inmunidad humoral es un componente importante de la respuesta inmune contra los virus, pero no es suficiente para erradicar muchas infecciones virales. Los

anticuerpos tienen efecto protector, sólo en las primeras etapas de la infección viral; además, es importante destacar que su capacidad neutralizante *in vitro*, tiene poca correlación con la capacidad protectora *in vivo*, y que es difícil transferir inmunidad antiviral a animales no inmunes sólo con anticuerpos purificados.

Un mecanismo fundamental de la inmunidad adaptativa contra las infecciones virales establecidas, está constituido por la inducción de linfocitos T citotóxicos, fundamentalmente los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, que reconocen antígenos virales asociados a moléculas MHC clase I, sintetizados en el interior de las células infectadas. Los linfocitos T citotóxicos diferenciados, ejercen su efecto antiviral por tres mecanismos:

- a) muerte de la célula infectada por liberación dentro de esta de gránulos, que contienen entre otras macromoléculas, una proteína formadora de poros (perforina o citolisin) que provoca su lisis;
- b) estimulación de enzimas intracelulares que degradan los genomas virales;
- c) secreción de citoquinas, más específicamente IFN- $\gamma$  y linfoxina (LT), en menor grado IL-2. Aunque estas células producen citoquinas, no lo hacen en cantidades suficientes, o en los tipos necesarios para generar la diferenciación completa de sus precursores en linfocitos T citolíticos activos y diferenciados. De ahí la necesidad de las citoquinas producidas por las células T *helper* CD 4<sup>+</sup> mencionadas anteriormente. En algunas infecciones virales esta respuesta inmune es la causante de la lesión tisular.

Por ejemplo, en la infección producida por el virus de la hepatitis B, la lesión hepática está mediada principalmente por la respuesta inmune celular generada. De hecho, los individuos con deficiencias en las células T, padecen una enfermedad con menor daño hepático, pero con mayor tendencia a la cronicidad, y los inmunocompetentes padecen una enfermedad con lesiones hepáticas más severas, pero raramente se produce la enfermedad crónica.

## EVASIÓN DE LOS MECANISMOS INMUNES POR LOS VIRUS

### **Variación antigénica**

En muchos virus se ha identificado un gran número de tipos serológicamente diferentes. La capacidad viral de variar antigénicamente es uno de los mecanismos de evasión más difundido e ilustrado por muchos virus. En el VIH, por ejemplo, se observa una importante variabilidad genética fundamentalmente en los genes *env*, debida a los errores cometidos por la enzima transcriptasa reversa viral, que pueden conducir a cambios de hasta un 30% en regiones hiper variables de la Gp 120. Otro ejemplo conocido es el virus *Influenza*, en el cual la variación antigénica puede ser de dos tipos: menor o deriva antigénica, resultado de mutaciones puntuales en genes que codifican para HA y NA; y mayor o cambio antigénico, que obedecen a sustituciones o reordenamientos de segmentos enteros de RNA viral que producen un nuevo virus, para el que la población general no tiene inmunidad, ocasionando pandemias de gripe.

### **Supresión de respuesta inmune**

Este mecanismo queda ejemplificado por aquellos virus capaces de infectar células del sistema inmune, linfocitos o macrófagos, alterando su función e inhibiendo la inmunidad adaptativa. Este fenómeno de supresión inmune es visto en infecciones causadas por VIH, virus *Epstein Barr*, *citomegalovirus* y virus del sarampión, entre otros.

Otros mecanismos de evasión inmune viral incluyen la expresión limitada de antígenos en las membranas celulares (arenavirus, rabdovirus); la persistencia viral en sitios poco accesibles a la respuesta inmune (papilomavirus, *citomegalovirus*); la inhibición de expresión de moléculas MHC clase I (adenovirus); etc.

## CONCLUSIONES

El sistema inmune permite que los individuos sobrevivan al contacto con diferentes tipos de patógenos. Los mecanismos iniciales de defensa provistos por la inmunidad innata permiten eliminar muchos de los agentes infecciosos, y sientan las bases para el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa con alto grado de especificidad por el patógeno, que logra quebrar esa primer línea de defensa. Los mecanismos efectores relevantes para eliminar distintos tipos de microorganismos, varían según las características de virulencia y patogenicidad de éste. La resolución de una infección se acompaña de la muerte de la mayoría de las células efectoras, y de la generación de células de memoria.

Muchos microorganismos han desarrollado sistemas que le permiten evadir la respuesta inmune. El conocimiento detallado del sistema inmune y de la patogénesis de los agentes infecciosos, nos permite diseñar alternativas para estimular artificialmente el sistema inmune, y así poder responder efectivamente frente a ellos. Las vacunas son el ejemplo más importante de ello. Los avances en el conocimiento de la inmunobiología y la patogénesis microbiana, permiten un diseño más racional de estas aproximaciones, y puede resultar en el desarrollo de nuevas vacunas contra agentes patógenos que hasta ahora han resultado elusivos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, Litchman. *Cellular and Molecular Immunology*. 5<sup>th</sup> ed.USA Elsevier Science; 2003.
2. Campbell J, Butcher E. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Op Immunology* 2000; (12): 336-41.
3. Galucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Op Immunology* 2001; (13): 114-9
4. Janeway C, et al. *Immunobiology. The immune system in health and disease*. 5<sup>th</sup> ed. New York Garland Publishing; 2001.
5. Lipscomb M, Masten B. Dendritic cells: Immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 2002; (82): 97-130.
6. Luster A. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Op Immunology* 2002; (14):129-36.