

# MANUAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA DE LA ASOCIACIÓN ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

## VOLUMEN I

### Bacterias de Importancia Clínica

**Editores**

**HORACIO A. LOPARDO**

Consultor Honorario del Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría  
"Prof. Dr. Juan P. Garrahan"

Profesor Consulto de Microbiología Clínica. Facultad de Ciencias Exactas.  
Universidad Nacional de La Plata

Miembro de la Comisión Directiva de SADEBAC,  
Asociación Argentina de Microbiología

**SILVIA C. PREDARI**

Jefa del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Médicas  
Alfredo Lanari. Universidad de Buenos Aires

Directora de la Revista Argentina de Microbiología, publicación científica oficial de la  
Asociación Argentina de Microbiología

Coordinadora del Comité de Emergencias Biológicas de la Red de Hospitales e  
Institutos de la Universidad de Buenos Aires

Miembro de la Subcomisión de Bacterias Anaerobias, SADEBAC, Asociación  
Argentina de Microbiología

**CARLOS VAY**

Profesor Asociado de Microbiología Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Jefe Laboratorio de Bacteriología Departamento de Bioquímica Clínica. Hospital de  
Clínicas "Gral. José de San Martín"

Director Carrera de Especialización en Bacteriología Clínica. Facultad de Farmacia y  
Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.



## INDICE GENERAL

### Parte I. Temas generales de Microbiología Clínica

Parte Ia. Taxonomía bacteriana

Parte Ib. Métodos generales de identificación bacteriana

### Partell. Microorganismos aerobios y anaerobios facultativos

Parte IIa. Cocos gram positivos

Parte IIa.1. Cocos gram positivos, catalasa positivos

Capítulo IIa.1.1. *Staphylococcus* spp.

Capítulo IIa.1.2. Otros géneros

Apéndice I. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte IIa.2. Cocos gram positivos, catalasa negativos

Capítulo IIa.2.1. Estreptococos  $\beta$ -hemolíticos

Capítulo IIa.2.2. *Streptococcus pneumoniae*

Capítulo IIa.2.3 Estreptococos del grupo viridans

Capítulo IIa.2.4. *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Lactococcus*

Capítulo IIa.2.5. *Abiotrophia*, *Granulicatella*, *Gemella*, *Aerococcus* y bacterias relacionadas

Apéndice II. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte IIb. Bacilos gram positivos

Parte IIb.1. Esporulados

Parte IIb.2. No esporulados

Capítulo IIb.2.1 *Corynebacterium* spp. y bacterias relacionadas

Capítulo IIb.2.2. *Listeria*

Capítulo IIb.2.3. *Nocardia*

Capítulo IIb.2.4. Bacilos gram positivos, catalasa negativos

Capítulo IIb.2.5. Micobacterias

Apéndice III. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte IIc. Bacilos gram negativos

Parte IIc.1. Enterobacterias

Capítulo IIc.1.1. Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* diarregénico

Capítulo IIc.1.2. *Shigella* spp.

Capítulo IIc.1.3. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Cronobacter*, *Raoultella* y *Serratia*.

Capítulo IIc.1.4. *Salmonella*, *Edwardsiella* y *Citrobacter*

Capítulo IIc.1.5. *Proteus*, *Morganella* y *Providencia*

Capítulo IIc.1.6. *Yersinia* y otras enterobacterias.

Apéndice IV. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Capítulo IIc.2. Bacilos gram negativos no fermentadores

Capítulo IIc.2.1. *Pseudomonas*

Capítulo IIc.2.2. *Acinetobacter*

Capítulo IIc.2.3. *Burkholderia*

Capítulo IIc.2.4. *Flavobacterium*, *Chryseobacterium* y *Elizabethkingia*

Capítulo IIc.2.5. *Stenotrophomonas*

Apéndice V. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Capítulo IIc.3. Bacilos gram negativos oxidasa positivos y fermentadores de lactosa

Capítulo IIc.3.1. *Vibrio*

Capítulo IIc.3.2 *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Chromobacterium*

Capítulo IIc.3.3 *Pasteurella*

Apéndice VI. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Capítulo IIc.4. Bacilos gram negativos exigentes

Capítulo IIc.4.1. *Haemophilus*

Capítulo IIc.4.2 Bacilos gram-negativos del grupo HACEK (ACEKS)

Capítulo IIc.4.3 *Bordetella*

Capítulo IIc.4.4. *Brucella*

Capítulo IIc.4.5 *Helicobacter*

Capítulo IIc.4.6 *Campylobacter*

Apéndice VII. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte II d. Cocos gram negativos

Apéndice VIII. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte II e. Bacterias atípicas

Capítulo IIe.1 *Bartonella* y *Afipia*.

Capítulo IIe.2 *Legionella* Parte III.3.

Parte IIe.4. *Chlamydia*

Parte IIe.5 Micoplasmas

Parte IIe.6 Rickettsias y otras bacterias relacionadas

Apéndice IX. Métodos de identificación: fundamento y método.

Parte II f. Espiroquetas

Capítulo II f.1 *Treponema*

Capítulo II f.2 *Borrelia*

Capítulo II f.3 *Leptospira*

### **Parte III Microorganismos anaerobios**

Parte IIIa. Métodos de cultivo e identificación de microorganismos anaerobios

Parte IIIb. Cocos gram positivos anaerobios

Parte IIIc. Bacilos gram positivos anaerobios esporulados

Parte III d. Bacilos gram positivos anaerobios no esporulados

Parte III d. Bacilos gram negativos anaerobios

Parte III e. Cocos gram negativos anaerobios

Apéndice X. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

## **Parte IIc.4**

# **BACILOS GRAM NEGATIVOS EXIGENTES**

### **Editor responsable**

**HORACIO A. LOPARDO**

Consultor Honorario del Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría  
"Prof. Dr. Juan P. Garrahan"

Profesor Consulto de Microbiología Clínica. Facultad de Ciencias Exactas.  
Universidad Nacional de La Plata

Miembro de la Comisión Directiva de SADEBAC,  
Asociación Argentina de Microbiología

## Índice

Capítulo	Título	Pág
Indice general		2
Ilc.4	<b>Bacilos gram negativos exigentes</b>	4
Índice		5
Ilc.4.1	<b><i>Haemophilus</i></b>	9
	<b>Aspectos taxonómicos</b>	10
	<b>Portación y transmisión</b>	12
	<b>Epidemiología y significación clínica</b>	14
	<b>Aspectos patogénicos</b>	18
	Factores de virulencia	19
	<b>Conservación y transporte de muestras clínicas</b>	21
	<b>Características microbiológicas</b>	22
	Examen directo	22
	Métodos rápidos de detección de antígenos capsulares	23
	Técnicas moleculares	24
	Cultivo	25
	Identificación a nivel de género y especie	31
	Serotipificación capsular	37
	Identificación capsular por técnicas moleculares	39
	<b>Sensibilidad a los antibióticos</b>	42
	<b>Bibliografía</b>	48
Ilc.4.2	<b>Bacilos gram negativos del grupo HACEK (ACEKS) y microorganismos relacionados</b>	60
	<b>Introducción</b>	61
	<b>Aspectos taxonómicos</b>	62
	<i>Haemophilus, Actinobacillus y Pasteurella</i>	62
	<i>Cardiobacterium</i>	62
	<i>Eikenella y Kingella</i>	62
	<i>Pasteurella</i>	63
	<i>Capnocytophaga</i>	63
	<i>Dysgonomonas</i>	64
	<i>Streptobacillus</i>	64
	<i>Suttonella</i>	64
	<b>Hábitat e impacto clínico</b>	64
	<i>Aggregatibacter</i>	66
	<i>Actinobacillus</i>	68

	<i>Cardiobacterium</i>	69
	<i>Simonsiella</i>	69
	<i>Suttonella</i>	69
	<i>Eikenella</i>	70
	<i>Kingella</i>	71
	<i>Capnocytophaga</i>	73
	<i>Dysgonomonas</i>	73
	<i>Leptotrichia</i>	74
	<i>Pasteurella</i>	74
	<i>Mannheimia haemolytica</i> y otras bacterias relacionadas	75
	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	76
	Experiencia argentina global	77
	<b>Orientación diagnóstica</b>	78
	<b>Aislamiento</b>	79
	<b>Identificación a nivel de género y especie</b>	81
	<i>Actinobacillus</i> y <i>Aggregatibacter</i>	81
	<i>Capnocytophaga</i>	81
	<i>Cardiobacterium</i>	82
	<i>Suttonella</i>	83
	<i>Simonsiella</i>	83
	<i>Dysgonomonas</i>	83
	<i>Eikenella</i>	84
	<i>Kingella</i>	84
	<i>Pasteurella</i>	85
	<i>Streptobacillus</i>	85
	Pruebas bioquímicas y serológicas	86
	Métodos automatizados	90
	Identificación por el método de espectrometría de masa	90
	Métodos moleculares	91
	Sensibilidad a los antibióticos	92
	<b>Algoritmo de identificación dicotómica de microorganismos del grupo HACEK y géneros relacionados</b>	96
	<b>Bibliografía</b>	100
<hr/>	<hr/>	<hr/>
<b>Ilc.4.3</b>	<b><i>Bordetella</i></b>	109
	<b>Aspectos taxonómicos y descripción del género</b>	110
	<b>Factores de virulencia</b>	114
	<b>Coqueluche, tos convulsa o pertussis: enfermedad, transmisión y epidemiología</b>	117
	<b>Diagnóstico</b>	123
	Recolección, transporte y conservación de muestras clínicas	126
	Diagnóstico microbiológico	127
	Ensayos de inmunofluorescencia directa	132

	Diagnóstico molecular	132
	Diagnóstico serológico	136
	Interpretación e importancia de los resultados de laboratorio	139
	<b>Sensibilidad a los antibióticos</b>	140
	<b>Bibliografía</b>	142
<b>Ilc.4.4</b>	<b><i>Brucella</i></b>	<b>154</b>
	<b>Introducción</b>	155
	<b>Agente causal</b>	156
	<b>Aspectos taxonómicos</b>	157
	<b>Hábitat y epidemiología</b>	161
	Situación en la Argentina	162
	Salud Pública	163
	<b>Impacto clínico</b>	167
	<b>Definición de casos y clasificación</b>	169
	<b>Factores de virulencia</b>	171
	Adherencia	173
	Invasión	174
	<b>Diagnóstico microbiológico</b>	178
	Identificación a nivel de género y especie	178
	Características del cultivo	180
	Identificación y tipificación	182
	Mantenimiento de los cultivos	185
	Métodos moleculares	190
	Diagnóstico serológico	195
	<b>Bioseguridad</b>	198
	<b>Bioterrorismo</b>	199
	<b>Tratamiento</b>	200
	Tratamiento de la brucelosis en adultos	201
	Tratamiento de la brucelosis en niños mayores de 8 años	202
	Tratamiento de la brucelosis en niños menores de 8 años	202
	Tratamiento de la brucelosis en embarazadas	203
	Tratamiento posexposición	203
	Medidas preventivas	203
	<b>Bibliografía</b>	205
<b>Ilc.4.5</b>	<b><i>Helicobacter</i></b>	<b>213</b>
	<b>Introducción</b>	214
	<b>Aspectos taxonómicos</b>	215
	<b><i>Helicobacter pylori</i></b>	218
	Morfología microscópica	218
	Características culturales	219
	Factores de virulencia	219
	Hábitat, epidemiología e impacto clínico	225
	Sensibilidad a los antibióticos	227

	Diagnóstico de laboratorio	229
	<b>Consideraciones finales</b>	238
	<b>Bibliografía</b>	239
<hr/>		
<b>Ilc.4.6</b>	<b>Familia <i>Campylobacteraceae</i></b>	246
	<b>Características generales y constitución de la familia</b>	247
	<b>Género <i>Campylobacter</i></b>	247
	Epidemiología y características clínicas	251
	<i>Campylobacter jejuni</i>	254
	<i>Campylobacter coli</i>	259
	<i>Campylobacter lari</i>	260
	Otras especies de <i>Campylobacter</i> aisladas del hombre	260
	Diagnóstico bacteriológico. Aislamiento e identificación	263
	Sensibilidad a los antibióticos	271
	<b>Género <i>Arcobacter</i></b>	274
	<i>Arcobacter nitrofrigidis</i>	276
	<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	276
	<i>Arcobacter butzleri</i>	277
	<i>Arcobacter skirrowii</i>	278
	<i>Arcobacter thereius</i>	278
	<b>Bibliografía</b>	279
<hr/>		
	<b>Apéndice IV. Medios de cultivo y pruebas bioquímicas manuales</b>	292
	<b><i>Haemophilus</i></b>	292
	<b><i>Bordetella</i></b>	293
	<b><i>Brucella</i></b>	296



## **Capítulo II.c.4.1**

### ***Haemophilus***

#### **ADRIANA EFRON**

Servicio Bacteriología Clínica, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas  
ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, Ciudad Autónoma de Buenos Aires

#### **M. NANCY ORLANDO**

Sección Microbiología. Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez  
Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Profesora Consultora de Microbiología.  
Facultad de Medicina. Universidad Maimónides

Profesora Titular de Microbiología.  
Carrera Dermatocosiología. Universidad Maimónides

#### **MARÍA CELESTE LUCERO**

Servicio Antimicrobianos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas  
ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, Ciudad Autónoma de Buenos Aires

## Aspectos taxonómicos

Los miembros del género *Haemophilus* son bacilos gram negativos, inmóviles y no esporulados. En materiales biológicos presentan un pleomorfismo que va desde pequeños cocobacilos hasta bacilos largos filamentosos. Se trata de huéspedes obligados, tal es así que salvo raras excepciones (ej, *Haemophilus ducreyi*) son comensales de las mucosas del tracto respiratorio humano. Estas bacterias representan alrededor del 10% de la microbiota habitual de la mucosa orofaríngea <sup>54, 60</sup>.

Actualmente se reconocen las siguientes especies como agentes causales de infecciones en el género humano: *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus aegyptius*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus parahaemolyticus*, *H. ducreyi*, *Haemophilus pittmaniae* y *Haemophilus paraphrohaemolyticus* <sup>59, 83</sup>. Gran parte de las especies de origen animal originariamente incluidas en el género *Haemophilus* forman parte en la actualidad de los géneros *Pasteurella* y *Aggregatibacter*. Estos últimos, además del género *Haemophilus* y nuevos géneros, constituyen hoy la familia *Pasteurellaceae*.

Todas las especies de *Haemophilus* son anaerobias facultativas. Otra característica distintiva es que para su desarrollo *in vitro* requieren factores adicionales presentes en la sangre: factor X (hemina) y/o factor V (NAD).

*H. influenzae* requiere ambos mientras que la mayoría de las otras especies requiere solo uno. Desarrollan mejor en atmósfera húmeda con 5 -10% de CO<sub>2</sub>. La temperatura óptima de crecimiento es de 33 °C a 37 °C. Las especies de *Haemophilus*, excepto *H. ducreyi*, fermentan ciertos hidratos de carbono: glucosa, sacarosa, lactosa, manosa y xilosa (Tabla 1). Los productos finales obtenidos son los ácidos succínico,

**TABLA 1.** Especies de *Haemophilus*. Características diferenciales

Especies	Requerimiento de factores		Fermentación de					Producción de					
	X	V	GLU	SAC	LAC	XIL	MAN	CAT	IND	URE	ODC	β-Gal	HEM
<i>H. influenzae</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	V	V	V	-	-
<i>H. aegyptius</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+	-	-	V	-	+	V	+	-	-	+
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	+	+	-	-	+	V	V	V	V	V	-
<i>H. ducreyi</i>	+	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- <sup>b</sup>
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	+	+	-	-	-	V	-	+	-	V	+
<i>H. pittmaniae</i>	-	+	+	+	-	-	+	(+)	NC	NC	NC	+	+
<i>H. paraphrohaemolyticus</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	V	+

GLU: glucosa, SAC: sacarosa, LAC: lactosa, XIL: xilosa, MAN: manosa, CAT: catalasa, IND: indol, URE: ureasa, ODC: ornitina descarboxilasa, β-Gal: β-galactosidasa, HEM: hemólisis. V: variable (reacción positiva en el 11- 89 % de las cepas), (+) positivo débil, NC: no conocida, (+)<sup>a</sup>: positiva lenta en 90 % de las cepas, <sup>b</sup>: desarrollo tardío de hemólisis entre 11- 89 % de las cepas.

láctico y acético. Las especies de *Haemophilus* reducen los nitratos, dan positiva la prueba de fosfatasa alcalina y negativa la prueba de CAMP<sup>83</sup>.

Según criterios taxonómicos tradicionales *H. aegyptius* no debería ser una especie separada de *H. influenzae*. Existen entre ambos diferencias fenotípicas y serológicas: *H. aegyptius* crece mal en medios semisólidos, no fermenta xilosa, es indol negativo y tiene capacidad de hemaglutinar. También presenta dificultad para crecer en agar chocolate y no crece en agar tripteína de soja con agregado de factores X y V. Por otra parte, la experiencia clínica indica diferencias absolutas en el potencial patogénico de ambos microorganismos. Sin embargo, ninguna de estas características los diferencian inequívocamente. Además, estudios de hibridación de ADN revelan que son filogenéticamente una única especie<sup>50</sup>.

Existe una amplia diversidad genética en el género *Haemophilus*. Por ejemplo, los genomas de *H. ducreyi* y *H. influenzae* respectivamente muestran poca homología<sup>60</sup>.

## **Portación y transmisión**

*H. influenzae* es un huésped humano estricto. Representa alrededor del 10% de la microbiota bacteriana del tracto respiratorio superior de individuos sanos. *H. parainfluenzae* representa el 75% de la microbiota colonizante de la cavidad oral y la faringe pero está ausente en la cavidad nasal<sup>65</sup>. Las cepas de *H. influenzae* no capsuladas, principalmente los biotipos II y III, se encuentran en la faringe de la mayoría de los niños sanos pero constituyen menos del 2% de la microbiota bacteriana total<sup>34</sup>. Los clones de *H. influenzae* no capsulados presentes en el tracto respiratorio superior de portadores asintomáticos difieren de aquellos que producen

infección. En los individuos colonizados asintomáticos los clones varían continuamente con un promedio de duración de portación de uno a dos meses<sup>93</sup>. Sin embargo durante la infección predomina un único grupo clonal.

*H. influenzae* se transmite a través de las gotas de secreción respiratoria, ingresa al organismo, coloniza transitoriamente la faringe (durante semanas a meses) y solo en una pequeña proporción de casos se disemina por vía hematológica para producir enfermedad invasiva. Las tasas de portación de *H. influenzae* en adultos varían del 3 al 19% y en niños menores de 2 años del 44% al 81%. En la era prevacunal el 2,8% de los niños sanos presentaban cultivo nasofaríngeo positivo para *H. influenzae* tipo b en el primer año de vida y el 4% a los 5 años de edad. Además, entre un 30% y un 90% de los niños pueden ser portadores de *H. influenzae* no capsulados. La colonización por *H. influenzae* no capsulados dura entre 2 semanas y 5 meses. Dentro de los 3 meses el 90% de las cepas iniciales se hace indetectable<sup>2, 73, 85</sup>. Los factores asociados a mayores tasas de portación y de enfermedad invasiva por *H. influenzae* tipo b son el hacinamiento, la concurrencia a jardines maternos y la convivencia con un caso índice de enfermedad invasiva<sup>41, 93</sup>.

El fenómeno de colonización es un proceso dinámico que se caracteriza por la renovación de una mezcla de clones, con una duración media de portación de 1,4 a 2 meses<sup>35</sup>. Durante la colonización un único clon de *H. influenzae* domina la microbiota bacteriana de la faringe y la cavidad nasal. Al aumentar la edad disminuye la portación de *H. influenzae* en el tracto respiratorio superior. Los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica están persistentemente colonizados con uno o múltiples clones de *H. influenzae* no capsulados<sup>80</sup>.

La vacuna conjugada reduce la tasa de portación en los niños vacunados por producción de IgA secretoria local; de esta manera se elimina la portación de *H.*

*influenzae* tipo b y por lo tanto su transmisión. Así se disminuye el riesgo de exposición en no vacunados, lo que se conoce como protección “de rebaño” o efecto de inmunidad colectiva (gregaria)<sup>5, 73</sup>.

En un estudio realizado en la Argentina en una población de niños vacunados, menores de 5 años, se encontró una tasa de portación por *H. influenzae* tipo b muy baja, del 0,06% (0,11% para el grupo de 2 años y ausencia de portación para el grupo de 5 años). Se detectó *H. influenzae* en el 40% de las muestras, 4,8% eran bacterias capsuladas. Se encontraron todos los tipos capsulares (el más frecuente fue el f) y el biotipo predominante fue el I. Los factores asociados a la portación de *H. influenzae* fueron la edad (mayor frecuencia en menores de 1 año), convivir con algún hermano menor de 18 años y concurrir al jardín maternal<sup>96</sup>. El estudio de la portación de *H. influenzae* tipo b en niños adecuadamente vacunados se propone como un indicador para monitorear la efectividad de los esquemas de vacunación. En base a los resultados obtenidos en la Argentina, el esquema de 4 dosis no debería modificarse.

*H. pittmaniae* también es parte de la microbiota normal de la cavidad oral.

Se ha documentado colonización del cérvix por *H. ducreyji* luego de tener relaciones sexuales.

## **Epidemiología y significación clínica**

*H. influenzae* es reconocido como una importante causa de neumonía, bacteriemia, meningitis, epiglotitis, artritis séptica y celulitis<sup>15</sup>. La infección invasiva causada por *H. influenzae*, particularmente del tipo b, ha sido una de las mayores

causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, especialmente en niños menores de 5 años. La introducción de la vacuna contra *H influenzae* tipo b en los programas de inmunización de muchos países produjo una reducción marcada en la incidencia de enfermedad invasiva y portación<sup>86</sup>. En consecuencia ocurrió un incremento de enfermedad invasiva causada por otros tipos capsulares (principalmente a y f) y por cepas no capsuladas. *H. influenzae* no capsulado es reconocido como causa importante de sinusitis, otitis media aguda y bronquitis. Además es una de las causas más frecuentes de exacerbaciones en pacientes que sufren enfermedad pulmonar obstructiva crónica<sup>4, 102</sup>. También puede causar enfermedad invasiva como bacteriemia, neumonía, meningitis y sepsis neonatal<sup>34, 37, 80</sup>. Muy raras veces es causa de infección del tracto urinario<sup>16</sup>. *H. influezae* no b es causa de vulvovaginitis en niñas prepúberes<sup>45</sup>.

Hay trabajos que demuestran que en la era posvacunal la mayoría de las infecciones invasivas se deben a cepas no capsuladas y ocurren en los extremos de la vida en pacientes con condiciones predisponentes<sup>13, 30, 103</sup>. En menor frecuencia se aíslan los tipos c, d y e. *H. influenzae* tipo e es un patógeno oportunista que causa infecciones graves principalmente en pacientes adultos con enfermedad respiratoria de base y enfermedad hepática o con inmunidad alterada. Sin embargo pueden ocurrir casos ocasionales de enfermedad primaria grave, tales como meningitis, en niños previamente sanos<sup>12, 13</sup>. La distribución de la enfermedad invasiva por *H. influenzae* capsulado no b y no capsulado y su presentación clínica varía geográficamente<sup>3, 13</sup>. Se ha sugerido la hipótesis que cepas no b podrían ocupar potencialmente el nicho ecológico dejado libre por *H. influenzae* tipo b y en consecuencia incrementar el riesgo de enfermedad invasiva causada por este tipo de cepas, fenómeno conocido como reemplazo de serotipos<sup>1</sup>.

En la Argentina luego de la introducción de la vacuna al calendario nacional en el año 1997 se observó una drástica disminución de casos de meningitis por *H. influenzae* tipo b (de 400 casos anuales en 1995 a 14 en 2011). En un estudio de enfermedad invasiva por *H. influenzae* realizado en el Laboratorio Nacional de Referencia de Meningitis e Infecciones Respiratorias Agudas Bacterianas del INEI-ANLIS Carlos G. Malbrán se mostró que en el período 2005-2010, los no capsulados representaron alrededor del 60% de los aislamientos. Los del tipo b daban cuenta del 20%, los del tipo a del 14%, los del tipo f del 6% y los de los tipos c, d y e del 6% restante. Las proporciones de capsulados y no capsulados no mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos etarios. En meningitis predominaron los capsulados, principalmente a y b, mientras que en neumonía y bacteriemia, los no capsulados<sup>31</sup>. La biotipificación de aislamientos puede ser usada con propósitos epidemiológicos, pero es de menor valor para el manejo de los pacientes. Los biotipos I y II (ver más adelante) son los más prevalentes dentro de las cepas invasivas. Por ejemplo, el tipo b biotipo I está frecuentemente asociado con meningitis aguda en niños. Luego de la introducción de la vacuna se ha notado una mayor variabilidad de biotipos, incluyendo el III, IV y VIII<sup>26, 49</sup>. A su vez hay relación de tipos con determinados biotipos: el tipo b está más asociado al biotipo I, el tipo a al biotipo II<sup>94</sup>, el serotipo f al biotipo I<sup>14</sup> y los serotipos d y e al biotipo IV<sup>61</sup>. Dentro de las cepas no capsuladas se encuentra mayor diversidad de biotipos pero se observó una asociación con biotipos II y III en infección respiratoria<sup>37, 78</sup>. Lo mismo se observó en la Argentina en cuanto a la asociación entre tipos y biotipos<sup>31</sup>.

*Haemophilus influenzae* biogrupo *aegyptius* causa conjuntivitis epidémica altamente contagiosa que ocurre estacionalmente en climas cálidos. La emergencia de un clon altamente virulento produjo epidemias fatales de una enfermedad llamada



fiebre purpúrica brasilera (FPB) caracterizada por púrpura fulminante epidémica precedida por conjuntivitis purulenta en niños previamente sanos<sup>50</sup>.

*Haemophilus ducreyi* es el agente causal del cancroide o chancro blando, una úlcera genital con linfadenopatía inguinal asociada, que ocurre entre 2 y 7 días luego de la exposición. Es un patógeno humano obligado que entra al huésped a través de microabrasiones que ocurren durante el acto sexual y queda localizado primariamente en la piel. Durante la infección humana experimental los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y los macrófagos son rápidamente reclutados al sitio de entrada bacteriano. El microorganismo convive con los PMN y los macrófagos pero permanece extracelular<sup>6, 7</sup>. El cancroide ocurre con mayor frecuencia en países en desarrollo, incluyendo muchos de Asia, África y América Latina. Las epidemias de la enfermedad están asociadas con bajo nivel socioeconómico, higiene pobre, prostitución y drogadicción. Se piensa que las trabajadoras sexuales sirven como reservorio de la infección. La verdadera incidencia del cancroide es desconocida debido a las dificultades que presenta el diagnóstico de la infección por *H. ducreyi* y los recursos limitados en muchos países donde la enfermedad es endémica<sup>65</sup>.

*H. parainfluenzae* es causa de otitis media aguda, sinusitis aguda y exacerbación aguda de bronquitis crónica, aunque su rol en esas enfermedades es incierto. Raras veces se lo identificó como causa de endocarditis infecciosa. Los cultivos de sangre pueden ser negativos en el caso de endocarditis debido a la naturaleza exigente del microorganismo<sup>65</sup>.

Otras especies de *Haemophilus* han sido raramente implicadas como causas de infección en humanos aunque se documentaron casos individuales o series de casos de infección del tracto respiratorio inferior, sinusitis, conjuntivitis,

bacteriemias, infección de heridas, peritonitis, artritis, osteomielitis y abscesos de cerebro<sup>99</sup>.

## Aspectos patogénicos

El período de incubación de *H. influenzae* es poco conocido. La presencia de una infección viral precedente o concomitante puede potenciar la infección. Las bacterias colonizantes invaden la mucosa y entran al torrente sanguíneo. La naturaleza antifagocítica de la cápsula de *H. influenzae* tipo b y la ausencia de anticuerpos anticapsulares llevan a una incrementada proliferación bacteriana. Cuando la concentración de bacterias excede un nivel crítico se disemina a varios sitios como meninges, tejido subcutáneo, articulaciones, pleura, pericardio y pulmones. Los mecanismos de defensa del huésped incluyen la activación de las vías clásica y alterna del complemento y la producción de anticuerpos contra el polirribosil ribitolfosfato (PRP) de la cápsula. Estos anticuerpos juegan un rol primario en conferir inmunidad. Los recién nacidos tienen un bajo riesgo de infección debido a la adquisición de anticuerpos maternos a través de la placenta. Cuando esos anticuerpos disminuyen, los niños están en alto riesgo de adquirir la enfermedad y la respuesta inmune baja, incluso luego de la enfermedad. Hacia los 5 años la mayoría de los niños adquieren anticuerpos naturalmente. La vacuna conjugada contra *H. influenzae* tipo b confiere protección por inducir anticuerpos contra el PRP de la cápsula<sup>77</sup>.

La patogénesis de *H. influenzae* se basa en su capacidad de resistir los mecanismos de defensa humanos incluyendo el sistema de complemento. Si bien como la mayoría de los gram negativos es sensible a la actividad citolítica del

sistema del complemento, ha desarrollado estrategias para inhibir esta acción. Además de atraer sobre su superficie reguladores del sistema del complemento específicos del huésped, hay otros factores involucrados en la evasión de la actividad mediada por complemento como la cápsula, lipooligosacáridos y proteínas de membrana externa. El conocimiento de estos mecanismos contribuye al desarrollo de vacunas y nuevas terapias dirigidas, por ejemplo, a pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica<sup>47</sup>.

### **Factores de virulencia**

La cápsula es el mayor factor de virulencia de las cepas invasivas de *H. influenzae*. Las cepas capsuladas pertenecen a 6 serotipos: a, b, c, d, e y f<sup>91</sup>. El tipo b es el más virulento. La cápsula de *H. influenzae* tipo b está compuesta por PRP. La concentración de polisacárido dentro de estas cepas parece ser importante para la supervivencia bacteriana debido a que una producción incrementada de polisacárido está asociada con una resistencia incrementada a la lisis<sup>105</sup>. En *H. influenzae* tipo b se ha encontrado que la amplificación del *locus* capsular inhibe la bacteriólisis mediada por complemento y la opsonización. El *locus* Cap b contiene los genes responsables para la expresión de la cápsula para el tipo b, y en la mayoría de las cepas se requieren dos copias para la expresión de la cápsula. Los aislamientos de *H. influenzae* tipo b de pacientes con enfermedad invasiva frecuentemente tienen tres o más copias del *locus* Cap b<sup>23</sup>. La cápsula confiere resistencia a la actividad bactericida del suero, a la fagocitosis y disminuye la opsonización mediada por el complemento.

Las cepas del tipo a son las que tienen polisacáridos capsulares más estrechamente relacionados a los del tipo b. La amplificación capsular y la delección de la IS1016 ha sido identificada en aislamientos de *H. influenzae* tipo a. Se observó que la meningitis por tipo a tenía una tasa de letalidad similar a la correspondiente al tipo b. Por el contrario, los casos producidos por los tipos e, f y cepas no capsuladas ocurrieron en edades mayores y mostraron un mejor pronóstico<sup>68</sup>. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos sobre la caracterización de enfermedad invasiva por *H. influenzae* no tipo b y sostienen la hipótesis que las cepas tipo a son las más virulentas luego de las del tipo b. La delección de la IS1016 en *H. influenzae* tipo a estabiliza el *locus* duplicado y guía a una producción incrementada de polisacárido capsular al igual que en *H. influenzae* b<sup>56, 63</sup>.

*H. influenzae* b además, posee una proteína principal de la membrana externa, (Hsf: *Haemophilus surface fibrils*) y una proteína E, que es una adhesina que se une a la vitronectina de la célula del hospedero y así inhiben la actividad bactericida del complemento<sup>47, 48</sup>.

Los aislados no capsulados de *H. influenzae* también poseen factores que confieren resistencia al suero. Dentro de ellos se destaca el lipooligosacárido (LOS), glicolípido principal de la membrana externa, que a diferencia de lo que sucede en la mayoría de los gram negativos carece de cadena O. También podemos mencionar a la fosforilcolina, que además se correlaciona con su capacidad de colonizar y persistir en las mucosas, el ácido siálico, que es incorporado de las células del hospedero (*H. influenzae* es incapaz de sintetizar ácido siálico), la proteína de membrana externa P6 y la proteína E (al igual que *H. influenzae* tipo b)<sup>39, 46, 81</sup>.

La proteína D (PD) es una lipoproteína de superficie altamente conservada que se encuentra en *H. influenzae*, incluso en las cepas no capsuladas. Esta

proteína está involucrada en la patogénesis de las infecciones del tracto respiratorio debido a que interfiere en la función ciliar de las células nasofaríngeas y aumenta la capacidad de producir otitis media aguda (OMA). Un mecanismo probable que indica que PD es un factor de virulencia es su actividad de glicerofosfodiesterasa, lo cual lleva a la liberación de fosforilcolina de las células epiteliales del hospedero. Se ha demostrado que la proteína D utilizada como *carrier* en la vacuna conjugada 11-valente contra el neumococo induce una respuesta protectora en humanos contra la OMA causada por *H. influenzae* no capsulado <sup>42</sup>.

Se han hipotetizado como factores de virulencia de *H. aegyptius* productor de fiebre purpúrica brasilera: el plásmido 3031, un polisacárido capsular, *pili*, de composición proteica que jugarían un rol en la adherencia de *H. aegyptius* a la conjuntiva y las hemaglutininas responsables de las manifestaciones hemorrágicas de la fiebre purpúrica brasilera.

## **Conservación y transporte de muestras clínicas**

El transporte inmediato de las muestras de sangre y LCR al laboratorio es mandatorio para lograr un diagnóstico rápido y asegurar la viabilidad de los microorganismos. Idénticas consideraciones deben ser tenidas en cuenta para otros líquidos de punción como sinovial, pleural, pericárdico, oído medio, etc., y para abscesos. En el caso de muestras respiratorias, la demora en el procesamiento implica además el sobrecrecimiento de la flora comensal. Lo mismo podría ocurrir con las muestras de contenido vaginal.

Cuando se plantean estudios de portación la muestra nasofaríngea se debe tomar con hisopo de dacrón o alginato de calcio<sup>106</sup>. En ambos casos se procederá a la siembra directa o se enviarán al laboratorio en medio de transporte.

Ante la sospecha de conjuntivitis purulenta causada por especies de *Haemophilus* la muestra debe ser enviada en medio de transporte adecuado o inoculada directamente en los medios de cultivo apropiados. Esto es particularmente importante para la recuperación de las especies más exigentes como *H. aegyptius*<sup>50</sup>.

Otra situación a considerar es la búsqueda de *H. ducreyi*. La muestra debe ser tomada con hisopo o ansa desde el borde de la lesión chancroide. Si existiesen nódulos linfáticos purulentos, la punción de los mismos puede complementar el diagnóstico pero la recuperación es sustancialmente menor que a partir del material obtenido de las úlceras. La siembra directa aumenta las posibilidades de aislar el microorganismo<sup>75</sup> aunque el uso de medios de transporte es una alternativa válida.

LCR, otros líquidos de punción y muestras de abscesos se recogen y envían al laboratorio en tubo plástico estéril con tapa a rosca. Otra alternativa es el uso de frascos de hemocultivo. Aquellas muestras obtenidas por hisopado y que no serán sembradas inmediatamente se podrán transportar en los medios Amies con carbón activado o Stuart.

## **Características microbiológicas**

### **Examen directo**

#### Morfología microscópica

En muestras clínicas *H. influenzae* puede ser relativamente pleomórfico observándose formas cocoides, cocobacilares o bacilos cortos, largos o

filamentosos. Si bien es posible encontrar escaso número de bacterias, es importante la observación minuciosa ya que usualmente se encuentran cercanas a los leucocitos polimorfonucleares.

Dada la naturaleza exigente de *H. aegyptius*, es muy valiosa la visualización microscópica del microorganismo en muestras de conjuntiva, particularmente en pacientes con conjuntivitis estacional. Se pueden ver como bacilos largos y delgados<sup>50</sup>.

En el caso de *H. ducreyi*, la sensibilidad de la tinción de Gram no supera el 50%, en parte porque las úlceras suelen ser polimicrobianas. Una característica distintiva de *H. ducreyi* es la disposición en forma de “banco de peces”: los bacilos se agrupan en columnas paralelas entre células o trozos de mucus. Sin embargo es poco frecuente esta observación en muestras clínicas<sup>74</sup>.

### **Métodos rápidos de detección de antígenos capsulares**

Existe una serie de técnicas inmunoquímicas para la detección del antígeno capsular de *H. influenzae* b, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, y *Streptococcus agalactiae* en LCR, otros líquidos de punción, suero y orina. Las más utilizadas son contrainmunolectroforesis, coaglutinación y aglutinación con partículas de látex.

## Técnicas moleculares

Para detectar *H. influenzae* en muestras clínicas como LCR, plasma, suero y sangre entera se utilizan ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, basados principalmente en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esas técnicas se pueden realizar en forma múltiple para detectar otras bacterias causantes de meningitis como *N. meningitidis* y *S. pneumoniae*. Si bien la sensibilidad puede variar entre ellas, la especificidad es excelente<sup>19, 23, 84, 109</sup>.

Con la técnica de PCR convencional se amplifica una secuencia que codifica para una proteína externa de la membrana de *H. influenzae*, P2<sup>40, 53</sup>. También se utiliza la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR) en formato múltiple con sondas fluorogénicas para la detección de estos tres microorganismos<sup>97</sup>. Utiliza como secuencia blanco el gen *bexA*, del transporte del polisacárido capsular de *H. influenzae*, el cual detecta los tipos a, b, c, y d pero no el e ni el f<sup>23</sup>; tampoco detecta *H. influenzae* no capsulados. La sensibilidad de la RT-PCR en LCR es del 66,7% para *H. influenzae* y la especificidad varía del 98,9% al 100%. Para mejorar la sensibilidad se ha desarrollado un nuevo ensayo que detecta *H. influenzae* independientemente de la presencia de cápsula<sup>110</sup>. La sensibilidad en suero es menor que en LCR debido a la presencia de sustancias inhibidoras. Para la evaluación adicional de las muestras que dan cultivo negativo a pesar de un resultado positivo de RT-PCR, se realiza una segunda RT-PCR que utiliza genes específicos de tipo para *H. influenzae*<sup>70</sup>.

Se han desarrollado técnicas moleculares para la detección directa de *H. ducreyi* de muestras clínicas dada la variabilidad en la sensibilidad diagnóstica para el chancroide, 33% a 80%<sup>25</sup> y la sensibilidad del cultivo de alrededor del 75%<sup>75</sup>.



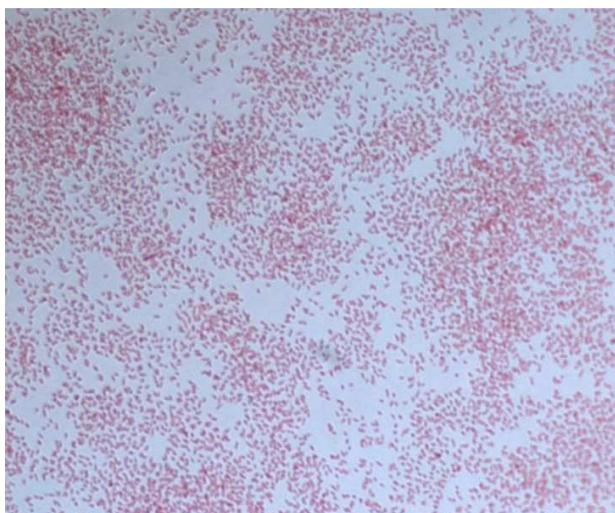
El uso de métodos moleculares para la identificación de otras especies de *Haemophilus* en muestras clínicas ha mostrado baja sensibilidad y especificidad, lo cual es particularmente cierto en casos de bacteriemia<sup>9</sup>. La baja sensibilidad se debe al bajo número de microorganismos presentes. Para alcanzar una sensibilidad adecuada se requieren grandes volúmenes de sangre o de LCR, lo que hace laboriosa la técnica de extracción de ADN, con poca relevancia clínica.

En muestras respiratorias las especies comensales de *Haemophilus* hacen que los resultados de las técnicas moleculares sean no concluyentes. Además, la presencia de otros microorganismos presentes puede originar resultados falsamente positivos. Por estas razones, hasta el momento, las técnicas moleculares no parecen ser aptas para ser aplicadas al diagnóstico de *Haemophilus* spp. en muestras clínicas<sup>66</sup>.

## **Cultivo**

### Microscopía

Los aislamientos de *Haemophilus* se visualizan como pequeños bacilos gram negativos con distintos grados de pleomorfismo (Figura 1). El pleomorfismo más importante, que incluye formas de filamentos largos, aparece relacionado a las especies no dependientes del factor X<sup>60</sup>.



**Figura 1.** Coloración de Gram de una colonia de *H. influenzae*.

### Medios de cultivo

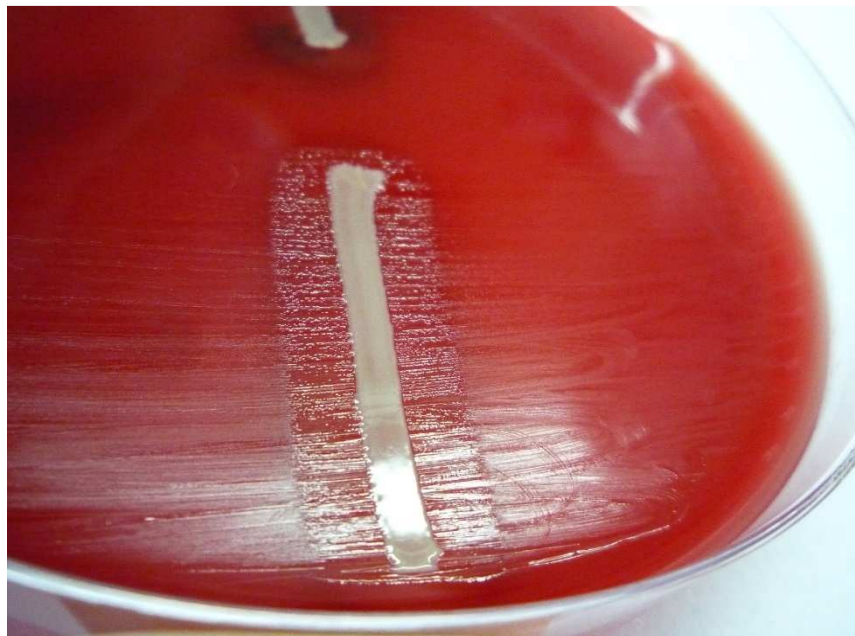
Para el aislamiento de especies de *Haemophilus* hay que tener en cuenta los requerimientos nutricionales especiales de este grupo de bacterias (Tabla 1) Ambos factores de crecimiento, X (hemina) y V (NAD o NADP) están presentes en los glóbulos rojos, pero solo el factor X está directamente disponible en el agar sangre convencional. Luego de un breve calentamiento, el factor V se libera de los eritrocitos, como ocurre en la preparación del agar chocolate. Este se obtiene al adicionar la sangre (5 % ovina o equina) al medio base cuando la temperatura es aproximadamente de 80 °C, inmediatamente después del proceso de autoclavado.

El medio sólido más apropiado para el crecimiento de *H. influenzae*, *H. parainfluenzae* y el resto de las especies de importancia en humanos, excepto *H. ducreyi*, consiste en un medio base que contiene agar, peptonas, extracto de levadura, extracto de corazón, NaCl y soluciones *buffer* (p. ej. agar base Columbia o

infusión cerebro corazón) más 5% de sangre de carnero y 1% de suplemento Britalex (Laboratorios Britania), PolyViteX (bioMèrieux) o IsoVitaleX (Becton Dickinson). Estos suplementos contienen glucosa, cistina, glutamina, adenina, tiamina, vitamina B<sub>12</sub>, guanina, hierro y ácido aminobenzoico y proveen una suplementación adecuada para el crecimiento de *H. ducreyi* y *H. aegyptius*.

Para el aislamiento selectivo se agrega bacitracina en concentración final de 300 mg/ml al medio antes mencionado. Este es el medio indicado para cultivar muestras respiratorias ya que el desarrollo de la microbiota comensal dificulta la recuperación de especies exigentes como las del género *Haemophilus*.

El fenómeno de “satelitismo” que puede observarse en cultivos primarios en agar sangre hace presumir la presencia de especies de *Haemophilus* dependientes de factor V (Figura 2). Sin embargo otras bacterias de la familia *Pasteurellaceae*<sup>83</sup>, como así también algunos estreptococos pueden mostrar un crecimiento satélite.



**Figura 2.** Fenómeno de satelitismo observado con *H. influenzae* en agar sangre.

Para *H. aegyptius*, que es particularmente exigente, el agar chocolate suplementado es un buen medio de cultivo, aunque no es de esperarse un crecimiento exuberante en la siembra directa de muestras clínicas<sup>50</sup>.

Ante la sospecha de infección por *H. ducreyi*, se presentan dos dificultades: la característica exigente del microorganismo y la naturaleza polimicrobiana de la muestra. Es así que para resolver esto se sugiere cultivar en dos medios diferentes. Los recomendados son: CG-HgS (agar base Columbia más 1% de hemoglobina bovina, 5 % de suero fetal bovino y 1% de suplemento IsoVitaleX) y MH-HH (agar chocolate con base Mueller Hinton y 5% de sangre de caballo más 1% IsoVitaleX). En ambos casos se agrega 3 mg/litro de vancomicina<sup>90</sup>.

Los sistemas de cultivo automatizados muestran una muy buena recuperación de *Haemophilus*, principalmente cuando se trata de muestras de sangre<sup>87, 94</sup>.

La temperatura óptima de incubación para el crecimiento de todas las especies de *Haemophilus* es de 35 °C a 37 °C, salvo para *H. ducreyi* que crece significativamente mejor a 33 °C. La atmósfera recomendada es de 5 a 10 % de CO<sub>2</sub>, con presencia de humedad. Con estas condiciones de atmósfera, temperatura y medios de cultivo se espera el crecimiento luego de 18-24 horas. Para muestras con sospecha de *H. aegyptius* y *H. ducreyi* puede ser necesaria una incubación de hasta 5 días.

### Características de las colonias

Con la excepción de *H. ducreyi*, todas las especies de *Haemophilus* de importancia en humanos requieren factor V para desarrollar.

Las especies hemolíticas son: *H. haemolyticus*, *H. parahaemolyticus*, *H. paraphrohaemolyticus* y *H. pittmaniae*. Sin embargo, se han encontrado cepas de *H. haemolyticus* que no presentan dicha característica <sup>54</sup>.

En agar chocolate las colonias de *H. influenzae* son grisáceas, semiopacas, uniformes, con un diámetro aproximado de 1 a 2 mm luego de 24 horas de incubación (Figura 3, izquierda). Cuando se trata de cepas capsuladas suele observarse una apariencia mucosa de las colonias y en áreas de desarrollo denso el crecimiento puede ser confluyente (Figura 3 derecha).

Las colonias de *H. parainfluenzae* pueden tener hasta 2 mm de diámetro a las 24 horas de incubación. La apariencia es variable ya que pueden observarse tanto planas, como rugosas y/o mucosas. Son grisáceas y semiopacas (Figura 4).



**Figura 3** (izquierda). Morfología de colonias de *H. influenzae* en agar chocolate; (derecha) morfología de colonias de *H. influenzae* tipo b mucosas en agar chocolate.



**Figura 4.** Morfología de colonias de *H. parainfluenzae* en agar sangre de carnero al 5% con agregado de factor V.

*H. paraphrohaemolyticus* crece como colonias pequeñas rugosas cuyo diámetro rara vez excede 1 mm. Si la incubación se produce con una concentración extra de CO<sub>2</sub>, las colonias pueden verse de diferentes formas y tamaños, lo cual “simula” un cultivo polimicrobiano.

Los aislamientos primarios de *H. aegyptius* se observan como colonias pequeñas y planas.

A las 24 horas de incubación, las colonias de *H. ducreyi* son puntiformes, no mayores de 0,5 mm de diámetro. Luego de 48-72 horas, alcanzan un diámetro de 1-2 mm. Las mismas son compactas, planas, no mucosas, de un color amarillo o amarillo-grisáceo.

En general los cultivos de *Haemophilus* producen un olor característico de “nido de ratones”. Algunas cepas de *Haemophilus* indol positivas dan como resultado un olor similar al de *Escherichia coli*.

## Conservación de aislamientos

Los aislamientos de *Haemophilus* pueden conservarse varios años a temperatura ambiente en leche descremada previo liofilizado. Otras alternativas son: incubación a -80 °C en caldo tripteína de soja con glicerol al 10% o en leche descremada al 10% P/V y a la misma temperatura en 300 µl de sangre de conejo.

A corto plazo (1 mes) se pueden conservar a – 20 °C en hisopo seco colocado en tubo plástico estéril o en leche descremada 10% P/V <sup>65, 106</sup>.

## **Identificación a nivel de género y especie**

La identificación y diferenciación de *Haemophilus* spp. se realiza a través de la determinación del requerimiento de los factores V y X, las pruebas de porfirinas y hemólisis, la determinación del patrón de fermentación de los hidratos de carbono y la producción de indol, ornitina descarboxilasa (ODC), ureasa, catalasa y β-galactosidasa (Tabla 1). El requerimiento de factores y la prueba de porfirinas proveen información para la identificación presuntiva a nivel de especie. La identificación definitiva requiere del ensayo de otras características fenotípicas.

La dependencia de factor X, además de ser estudiada mediante discos, se puede demostrar por la presencia o no de desarrollo en diferentes medios con y sin sangre respectivamente. Pero puede haber resultados erróneos debido al arrastre de factores a partir del inóculo. Por lo tanto la prueba de referencia es la de las porfirinas. El objetivo es probar si las especies de *Haemophilus* que no requieren hemina poseen la o las enzimas necesarias para sintetizar precursores del grupo



hemo a partir del ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA). Se basa en la detección de porfobilinógeno y/o porfirinas, ambos metabolitos intermedios en la biosíntesis de hemina<sup>60</sup>. El sustrato utilizado es clorhidrato de ácido  $\delta$  – aminolevulínico (ALA) 2 mM y  $MgSO_4$  0,8 mM en *buffer* de fosfatos 0,8 mM (pH = 6,9). Se parte de un inóculo denso y luego de 4 horas de incubación a 35 °C, se observa la aparición de fluorescencia rojo ladrillo bajo luz UV de 360 nm de longitud de onda. Los tubos con resultados dudosos deben incubarse 24 horas.



**Figura 6.** Requerimiento de factores de *H. influenzae* en agar tripteína de soja.

Al cabo de ese tiempo, una alternativa es revelar con reactivo de Kovacs, agitar y observar un color rojo en la fase acuosa inferior. Se debe incluir un tubo control negativo sin ALA para eliminar falsos positivos por la presencia de indol.



## Pruebas bioquímicas convencionales

La hemólisis de las especies *H. haemolyticus*, *H. parahaemolyticus* y *H. pittmaniae* puede ser detectada en agar sangre bovina, equina o de conejo, pero no de carnero. Para estudiar la hemólisis en *H. ducreyi* se requieren medios especiales 60, 90 .

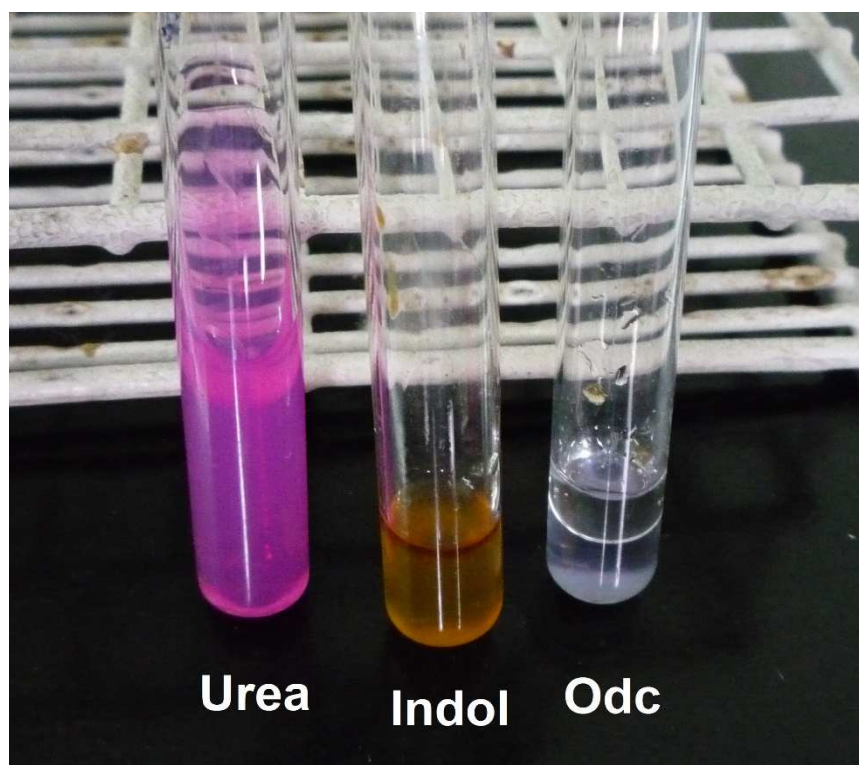
Las pruebas de fermentación de azúcares pueden realizarse con tabletas comerciales o en caldo rojo de fenol con 1% del hidrato de carbono, suplementado con 10 µg/ml de NAD y 2,2 ml de una solución de hemina al 0,05% en 100 ml de medio. Se utilizan los siguientes sustratos: glucosa, lactosa, manitol, manosa, sacarosa y xilosa y un tubo control con caldo base sin el agregado de hidratos de carbono.

La fermentación de la lactosa requiere de dos enzimas: la permeasa, que introduce la lactosa en la célula y la  $\beta$ -galactosidasa, que hidroliza la lactosa en galactosa y glucosa. Algunos microorganismos pierden la permeasa, pero producen  $\beta$ -D-galactopiranosas, la cual es detectada con la prueba del ONPG. El ONPG (o-nitrofenil galactósido), es más permeable a través de la pared celular bacteriana que la lactosa. La  $\beta$ -galactosidasa presente en el microorganismo, hidroliza el ONPG en galactosa y ortonitrofenol y se desarrolla un color amarillo.

Se suspende una ansada de cultivo en 0,2 ml de solución fisiológica, se coloca un disco de ONPG y se incuba 30 minutos a 37 °C. Se espera 4 horas antes de descartar una reacción como negativa.

## Biotipificación

Otras pruebas bioquímicas útiles, tanto para diferenciar y biotipificar especies de *Haemophilus*, como para separarlos de otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* son: producción de indol, actividad de ureasa y producción de ornitina descarboxilasa (Figura 7). En los tres casos se pueden realizar pruebas rápidas, las cuales se leen a las 4 horas. De esta forma se minimiza el problema de los requerimientos especiales (la prueba de ornitina descarboxilasa puede requerir 18 a 24 horas adicionales). Es de máxima importancia trabajar con un inóculo importante a partir de un aislamiento puro en agar chocolate.



**Figura 7.** Pruebas bioquímicas convencionales con reacción positiva para determinación de biotipo de *H. influenzae* y *H. parainfluenzae*.

Odc: ornitina descarboxilasa

El sustrato indicado para la prueba de indol es L-triptófano 1% en 0,05 M de *buffer* de fosfatos (pH= 6,8). Luego de 4 horas de incubación se revela con reactivo de Kovacs. La aparición de un anillo rojo en la fase alcohólica indica la presencia de indol.

La prueba de ureasa se realiza en caldo rojo de fenol que contiene 0,1g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g NaCl y 0,5 ml de rojo de fenol (1:500) disueltos en 100 ml de agua destilada, pH final 7,0. Se agrega una solución acuosa de urea al 20%. Se incuba 4 horas a 35 °C sin atmósfera de anhídrido carbónico. La aparición de un color rojo indica una prueba positiva. También es válido usar el agar urea de Christensen; en este caso la incubación es de 24-48 horas.

La prueba de ornitina descarboxilasa puede realizarse mediante tabletas impregnadas o con el método clásico (medio de Möeller). En ambos casos la lectura se hará a las 24 horas; la aparición de coloración púrpura o violeta indica una prueba positiva.

En base a estas tres pruebas *H. influenzae* y *H. parainfluenzae* pueden clasificarse en biotipos (Tabla 2).

### Métodos automatizados y miniaturizados

Existen sistemas comerciales para la identificación y diferenciación de las especies de *Haemophilus*, la mayoría en forma miniaturizada. Todos emplean una batería de pruebas bioquímicas convencionales. La ventaja que presentan con respecto a la metodología tradicional es que los resultados están disponibles en menor tiempo. Algunos de ellos son: IDS RapID NH (Remel, Lenexa, KS); API NH

bioMérieux (Marcy l'Etoile Francia); BBL Crystal *Neisseria / Haemophilus* ID system (BD) y VITEK®2 tarjeta NH bioMérieux<sup>10, 76</sup>.

**TABLA 2.** Biotipos de *Haemophilus influenzae* y *H. parainfluenzae*

Especie	Biotipo	Producción de:		
		Indol	Ornitina descarboxilasa	Ureasa
<i>H. influenzae</i>	I	+	+	+
	II	+	+	-
	III	-	+	-
	IV	-	+	+
	V	+	-	+
	VI	-	-	+
	VII	+	-	-
	VIII	-	-	-
<i>H. parainfluenzae</i>	I	-	-	+
	II	-	+	+
	III	-	+	-
	IV	+	+	+
	V	-	-	-
	VI	+	-	+
	VII	+	+	-
	VIII	+	-	-

El sistema RapID NH contiene 11 pruebas bioquímicas en “microceldas”.

Tanto API NH como BBL Crystal *Neisseria / Haemophilus* consisten en un esquema miniaturizado. En ambos se obtienen los resultados en < 6 h. Crystal emplea 29 sustratos y se basa en la conversión cromogénica y fluorogénica luego de 5 horas de incubación.

API NH contiene 12 sustratos deshidratados y una celda para la detección de  $\beta$ -lactamasa. Permite identificar *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp. y *Moraxella* spp.<sup>76</sup>

No han sido publicados estudios independientes que comparen API NH y BBL Crystal *Neisseria / Haemophilus* con un *gold standard* aceptable.

VITEK®2 compact es un sistema altamente automatizado para identificación y sensibilidad a los antimicrobianos. Las pruebas se realizan mediante la utilización de tarjetas plásticas que contienen *micro-wells* con sustratos bioquímicos deshidratados. La tarjeta NH identifica 27 taxones de bacterias exigentes gram negativas: fundamentalmente *Haemophilus* spp. y *Neisseria* spp.; pero también incluye especies de *Actinobacillus*, *Campylobacter*, *Moraxella*, *Capnocytophaga*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Gardnerella*, *Kingella*, *Oligella* y *Suttonella*. Los resultados se obtienen entre 6 y 8 horas <sup>10</sup>. Se ha demostrado que el 95% de los aislamientos de *H. influenzae*, *H. parahaemolyticus* y *H. parainfluenzae* fueron identificados correctamente por VITEK®2; mientras que *H. haemolyticus* no pudo ser identificado en ningún caso <sup>76</sup>.

### **Serotipificación capsular de *Haemophilus influenzae***

*Haemophilus influenzae* capsulado expresa uno de seis polisacáridos capsulares químicamente distintos (tipos a, b, c, d, e, f) <sup>91</sup>. La introducción de la vacuna conjugada produjo una marcada disminución de las enfermedades invasivas causada por *H. influenzae* tipo b en aquellos países donde ésta fue utilizada extensivamente <sup>17, 71, 96</sup>. Tradicionalmente los serotipos de *H. influenzae* han sido identificados por técnicas de aglutinación en lámina. Algunos de los métodos comerciales utilizados en nuestro país son Phadebact® *Haemophilus* Test (Bactus) y BD Difco™ *Haemophilus influenzae* Antisera. La prueba de coaglutinación Phadebact® *Haemophilus* Test permite la identificación rápida de *Haemophilus influenzae* tipificable (capsulado) y la diferenciación del tipo b de los otros tipos (a, c-

f) usando una técnica simple en portaobjetos. Contiene dos reactivos, reactivo tipo b, compuesto de anticuerpos específicos anti-tipo b y reactivo tipo a, c-f, compuesto de un *pool* de anticuerpos específicos anti-tipos a, c-f acoplados a la proteína A de estafilococos no viables<sup>19</sup>. Esta técnica deja libre la región Fab del anticuerpo, dándole una posición óptima de reacción con el antígeno. La red de coagulación es visible a ojo desnudo. El tiempo de lectura es de un minuto desde la mezcla del reactivo con la suspensión bacteriana. La sensibilidad para el reactivo del tipo b es del 98,8% y para el reactivo de los tipos a, c-f, del 97,3%. La especificidad para el reactivo del tipo b es del 97,6% y para el reactivo de los tipos a, c-f, del 96,6%. La desventaja de la prueba es que no permite diferenciar los tipos a, c, d, e, f entre sí. Esto se logra con la utilización de sueros monovalentes que van desde el a hasta el f y que son específicos para cada uno de los seis serotipos (BD Difco™ *Haemophilus influenzae* Antisera). La prueba consiste en una reacción de aglutinación en portaobjetos. Se parte de un cultivo puro en agar chocolate. El aislamiento se prueba primero con solución fisiológica. Si ocurre aglutinación (autoaglutinación) el cultivo es rugoso y no se podrá analizar. Se deberá realizar un subcultivo en agar chocolate para repetir la prueba. En caso que el aislamiento no resultara autoaglutinante se prueba con el *Antiserum Poly* para realizar la identificación presuntiva, seguida de las pruebas con los antisueros monoespecíficos. El tiempo de lectura es de un minuto. Los porcentajes de aglutinación se interpretan con cruces (1 a 4). El control positivo deberá producir una aglutinación de 3 o mayor y el control negativo no debe mostrar ningún indicio de aglutinación. Un resultado negativo con el *Antiserum Poly* indica que el aislamiento es no capsulado.

Las técnicas de serotipificación presentan sus limitaciones. Se comunicaron discrepancias en los resultados obtenidos entre laboratorios y diferencias

significativas en la prevalencia de serotipo b cuando se comparó la prueba de aglutinación en lámina que usa como *screening* el antisuero monoespecífico b y la técnica de PCR. Lo mismo ocurrió con los aislamientos no capsulados. Las discrepancias en la identificación de serotipos sugieren que la carga de enfermedad por *H. influenzae* tipo b como así también el estado de portador pueden ser erróneamente estimados, produciendo distorsiones en la evaluación del impacto por la vacuna conjugada contra *H. influenzae* b. El uso de los antisueros en paralelo mejoró la concordancia con la PCR <sup>8, 66</sup>.

Otro punto a tener en cuenta es el inóculo bacteriano. El uso de crecimiento bacteriano transferido directamente sobre el antisuero con un ansa puede llevar a errores de lectura, debido a que diferentes inóculos pueden ser usados en cada reacción. La suspensión de las bacterias en solución fisiológica es lo más apropiado para la reacción de aglutinación.

El uso de antisuero polivalente como reactivo de *screening* demostró tener un pobre poder discriminatorio.

## **Identificación y tipificación capsular de *H. influenzae* por técnicas moleculares**

### Técnica de PCR

La técnica de PCR se puede utilizar para la identificación de género y especie; los iniciadores empleados amplifican el gen que codifica para la porina proteína principal de membrana externa P2 (*ompP2*) presente tanto en cepas capsuladas como no capsuladas<sup>40</sup>. Para la tipificación capsular se desarrolló un

ensayo en el que se detecta el gen *bexA*, necesario para la expresión de la cápsula y los genes *cap*, específicos de cada uno de los tipos capsulares<sup>36, 61, 62</sup> (Tabla 3, Figura 8). De esta manera se pueden diferenciar los aislamientos capsulados de los no capsulados. Además, permite identificar mutantes deficientes en la cápsula del tipo b que han perdido el gen *bexA* (cepas b-). Estas cepas no pueden ser identificadas por la técnica de aglutinación en lámina debido a su incapacidad de expresar el polisacárido capsular.

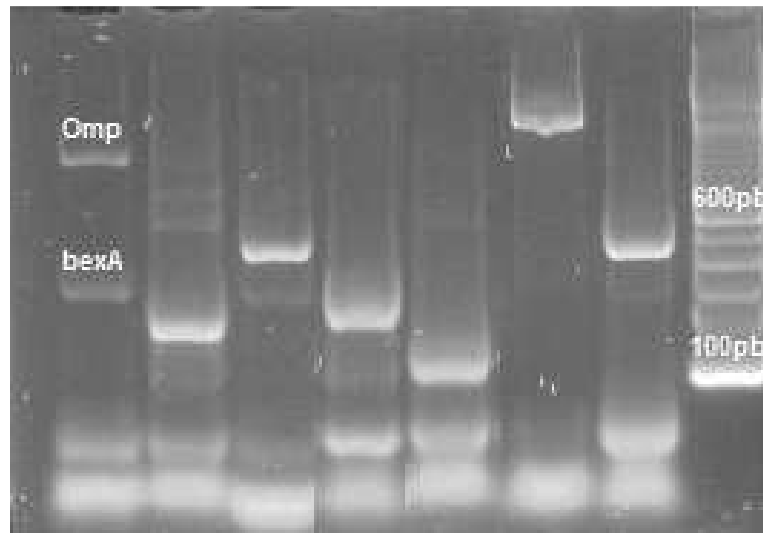
**TABLA 3.** Descripción de los oligonucleótidos iniciadores utilizados para identificación y tipificación capsular de *Haemophilus influenzae* y tamaño de los productos de PCR.

Iniciador	Secuencia	Especie o tipo capsular	Gen	Tamaño producto de PCR (pb)
a <sub>1</sub>	5'-CTA CTC ATT GCA GCA TTT GC-3'	a <sup>a</sup>	<i>cap</i>	250
a <sub>2</sub>	5'-GAA TAT GAC CTG ATC TTC TG-3'			
b <sub>1</sub>	5'-GCG AAA GTG AAC TCT TAT CTC TC-3'	b <sup>a</sup>	<i>cap</i>	480
b <sub>2</sub>	5'-GCT TAC GCT TCT ATC TCG GTG AA-3'			
c <sub>1</sub>	5'-TCT GTG TAG ATG ATG GTT CA-3'	c <sup>a</sup>	<i>cap</i>	250
c <sub>2</sub>	5'-CAG AGG CAA GCT ATT AGT GA-3'			
d <sub>1</sub>	5'-TGA TGA CCG ATA CAA CCT GT-3'	d <sup>a</sup>	<i>cap</i>	150
d <sub>2</sub>	5'-TCC ACT CTT CAA ACC ATT CT-3'			
e <sub>1</sub>	5'-GGT AAC GAA TGT AGT GGT AG-3'	e <sup>a</sup>	<i>cap</i>	1350
e <sub>2</sub>	5'-GCT TTA CTG TAT AAG TCT AG-3'			
f <sub>1</sub>	5'-GCT ACT ATC AAG TCC AAA TC-3'	f <sup>a</sup>	<i>cap</i>	450
f <sub>2</sub>	5'-CGC AAT TAT GGA AGA AAG CT-3'			
h <sub>1</sub>	5'-CGT TTG TAT GAT GTT GAT CCA GAC-3'	a, b, c, d, e, f, exportación de cápsula <sup>b</sup>	<i>bexA</i>	345
h <sub>2</sub>	5'-TGT CCA TGT CTT CAA AAT GAT G-3'			
O <sub>1</sub>	5'-ATA ACA ACG AAG GGA CTA ACG-3'	<i>H. influenzae</i> <sup>c</sup>	<i>ompP2</i>	1000
O <sub>3</sub>	5'-ACC TAC ACC CAC TGA TTT TTC-3'			

<sup>a</sup> Falla et al.<sup>37</sup>. <sup>b</sup> Kroll et al.<sup>64</sup>. <sup>c</sup> Forbes et al.<sup>41</sup>.

La técnica de RT-PCR utiliza sondas fluorogénicas para la identificación de los 6 tipos capsulares<sup>70</sup>. Este ensayo consume menos tiempo que la PCR convencional.





**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados con oligonucleótidos iniciadores específicos de *ompP2*, *bexA* y tipo capsular. Línea 1, *H. influenzae* capsulado; líneas 2 a 7, tipos capsulares a a f; línea 8, marcador de peso molecular 100 BP *ladder*.

La técnica de PCR resuelve los errores de interpretación de la prueba de aglutinación y provee el tipo capsular de cepas auto y poliaglutinantes. Además reconoce mutantes deficientes en cápsula. Por lo tanto es el método de elección para identificación del tipo capsular.

En un estudio realizado en la Argentina se encontró una concordancia global del 98,2% entre las técnicas de aglutinación en lámina con sueros monovalentes y la técnica de PCR. Esta alta concordancia se debió a que se utilizaron los antisueros monovalentes en paralelo. No se encontraron cepas con genotipo b-<sup>31</sup>.

#### Otros métodos moleculares de tipificación de *H. influenzae*

Para la detección de brotes y para una comprensión mejor de la naturaleza evolutiva de la enfermedad invasiva causada por *H. influenzae* se utilizan otras

técnicas de tipificación molecular. La técnica de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) demuestra una excelente separación de clones pero posee algunas desventajas: una gran variabilidad intra e interlaboratorio, los datos no son intercambiables fácilmente, es laboriosa y consume mucho tiempo <sup>3, 98</sup>. Otras metodologías con las que se obtiene un alto grado de separación incluyen la ribotipificación, análisis del polimorfismo de tamaños de fragmentos de restricción (RFLP), análisis del perfil de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente y tipificación según las secuencias de múltiples *loci* (MLST) <sup>11, 51</sup>. La ribotipificación consume mucho tiempo, el RFLP produce patrones complejos de bandas y el análisis del perfil de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente carece de reproducibilidad <sup>11</sup>. La MLST ofrece la ventaja de un poder discriminatorio superior porque combina tipificación por secuencias de siete genes conservados con resultados que pueden ser comparados confiablemente con otros laboratorios. El análisis de múltiples *loci* de número variables de repeticiones (MLVA) es un esquema de cuatro *loci* que ha demostrado tener un poder discriminatorio más alto que el MLST dentro de los aislamientos del serotipo b <sup>101</sup>.

### **Sensibilidad a los antibióticos**

*Haemophilus* es un género con especies exigentes que poseen requerimientos nutricionales especiales, debido a esto el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos no puede realizarse en agar Mueller Hinton estándar, sino en un medio que permita el crecimiento de estas especies. En 1988, el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) introdujo el *Haemophilus* Test Medium (HTM)

propuesto por Jorgensen y col., que es desde entonces el medio recomendado en nuestra región para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en aislamientos de *H. influenzae*<sup>58</sup>. El HTM está compuesto por caldo o agar MH suplementado con 0,5% de extracto de levadura, 15 µg/ml de β-NAD y 15 µg/ml de hematina bovina. Su composición es bien definida por lo que es reproducible y permite un crecimiento óptimo; y además, es un medio traslúcido, por lo que facilita la lectura de las zonas de inhibición y permite determinar la sensibilidad a trimetoprima/sulfametoxazol<sup>28</sup>.

Existen varios factores que pueden afectar la reproducibilidad de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en HTM, uno de ellos es el crecimiento inadecuado. Uno de los componentes cruciales del HTM es la hematina, que aporta el factor X requerido para el crecimiento de *H. influenzae*. Esta es difícil de disolver y muy inestable por lo que aislamientos con alto requerimiento de factor X no crecerán bien en medios mal preparados o almacenados por un largo período de tiempo (HTM es estable durante 4 a 6 semanas almacenado a 4 °C)<sup>28, 55</sup>. Otro factor que puede alterar los resultados de las pruebas de sensibilidad es el efecto inóculo. Este afecta a algunos antibióticos β-lactámicos como amoxicilina, cefaclor, cefamandol y moxalactam, principalmente en aislamientos de *H. influenzae* β-lactamasa positivos, aunque no es exclusivo de este mecanismo de resistencia. Para controlar esta variable, el CLSI especifica que se debe preparar el inóculo a partir de un cultivo en agar chocolate con un tiempo de incubación entre 20 y 24 h<sup>21, 29</sup>.

Las cepas salvajes de *H. influenzae* son sensibles a ampicilina, cefalosporinas, cloranfenicol, sulfonamidas, tetraciclinas y macrólidos. Sin embargo, una gran proporción de aislamientos clínicos son resistentes a ampicilina y otros

antibióticos  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol y tetraciclinas, debido principalmente, a la diseminación de plásmidos conjugativos.

La resistencia a ampicilina y otros  $\beta$ -lactámicos en *H. influenzae* está prácticamente limitada a la producción de  $\beta$ -lactamasa y en el caso de los aislamientos  $\beta$ -lactamasa-negativos-ampicilina-resistentes (BLNAR), se debe a la presencia de PBPs alteradas con baja afinidad por los  $\beta$ -lactámicos. Un muy bajo porcentaje de aislamientos poseen ambos mecanismos y se los denomina  $\beta$ -lactamasa-positivos-amoxicilina/ácido clavulánico-resistentes (BLPACR). No se ha demostrado resistencia a los  $\beta$ -lactámicos en *H. influenzae* debida exclusivamente a mecanismos de impermeabilidad o eflujo, aunque sí se ha informado un aumento del nivel de resistencia a ampicilina por mecanismos de eflujo en conjunto con alteración de la PBP3<sup>107</sup>.

La producción de  $\beta$ -lactamasa es, por lejos, el principal mecanismo de resistencia a  $\beta$ -lactámicos aunque presenta importantes variaciones regionales. En un estudio de vigilancia internacional se encontró desde un 6% de aislamientos  $\beta$ -lactamasa positivos en Alemania hasta un 65% en Corea del Sur, con una prevalencia promedio de 16,6%<sup>52</sup>. Las enzimas responsables de este mecanismo son TEM-1 y en menor medida ROB-1, ambas son serino  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de clase A de Ambler, inhibibles por ácido clavulánico y que presentan un fenotipo indistinguible entre sí. Estas enzimas le confieren resistencia a penicilina, ampicilina y amoxicilina. La presencia de las mismas generalmente aumenta la CIM de ampicilina a valores de sensibilidad intermedia o resistencia (CIM<sub>90</sub> 32  $\mu$ g/ml) por lo que son fácilmente detectables en el laboratorio, tanto por métodos de dilución como por difusión con discos<sup>38</sup>. Los aislamientos de *H. influenzae* productores de  $\beta$ -lactamasa permanecen sensibles a cefalosporinas y carbapenemes, así como a las

combinaciones con inhibidores de  $\beta$ -lactamasa como amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactama y piperacilina/tazobactama. La producción de  $\beta$ -lactamasa puede determinarse utilizando el método de la cefalosporina cromogénica (ej. nitrocefín), métodos iodométricos o métodos acidimétricos <sup>21</sup>.

Hasta el momento la prevalencia de aislamientos de *H. influenzae* BLNAR ha permanecido baja en todo el mundo pero es particularmente elevada en algunos países como Japón (34,5%), España, y Francia <sup>108</sup>. Este mecanismo de resistencia afecta no solo la sensibilidad a ampicilina sino también la sensibilidad a otros  $\beta$ -lactámicos, por lo que, cuando se detecta, debe informarse resistencia a ampicilina, ampicilina/sulbactama, amoxicilina/ácido clavulánico, cefaclor, cefuroxima, cefprozil, piperacilina/tazobactama, cefetamet, cefamandol, cefonicid y loracarbef a pesar de su aparente sensibilidad *in vitro* <sup>21</sup>. El fenotipo BLNAR presenta un nivel de resistencia variable a ampicilina: CIM entre 0,5 y 16  $\mu\text{g/ml}$ , rango que comprende aislamientos categorizados como sensibles (CIM  $\leq 1\mu\text{g/ml}$ ), intermedios (CIM =  $2\mu\text{g/ml}$ ) y resistentes (CIM  $\geq 4\mu\text{g/ml}$ ). Debido a esto, la prevalencia de BLNAR es difícil de determinar y puede ser subestimada en algunas regiones <sup>107</sup>.

Los aislamientos BLPACR, han sido detectados recientemente y representan un fenotipo de resistencia a  $\beta$ -lactámicos muy poco frecuente. Presentan CIM de ampicilina mayores (2-64  $\mu\text{g/ml}$ ) por la contribución de la  $\beta$ -lactamasa, pero las CIM de amoxicilina/ácido clavulánico y cefalosporinas son prácticamente iguales a las de los aislamientos BLNAR, por lo que también es difícil de determinar <sup>107</sup>. El significado clínico de estos aislamientos es confuso, pero debido a que poseen mutaciones en la PBP3, se debería seguir la recomendación del CLSI para BLNAR: informar resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico, cefuroxima y cefaclor independientemente de su sensibilidad *in vitro* <sup>21</sup>.

La resistencia a cefalosporinas de tercera generación es muy rara en *Haemophilus* spp. En España y Japón se informaron aislamientos con CIM de cefotaxima de 4 µg/ml que presentaban mutaciones en el gen *ftsI*<sup>43, 100</sup>. Este mismo fenotipo fue encontrado en la Argentina en un aislamiento clínico de *H. parainfluenzae* productor de TEM-1 que presentó mutaciones en el gen *ftsI* y sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas<sup>33</sup>. Hasta el momento, no se informó presencia β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) en *H. influenzae*; sólo se publicó el hallazgo de una BLEE TEM-15 en dos aislamientos genéticamente relacionados de *H. parainfluenzae* en Sudáfrica<sup>108</sup>.

La resistencia a cloranfenicol es mediada en la mayoría de los casos por la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT).

La resistencia a tetraciclina en *H. influenzae* y *H. parainfluenzae* está ligada al mecanismo de eflujo codificado por el gen *tetB*. Este gen está localizado usualmente en un plásmido que puede transportar también los genes de resistencia a ampicilina y a cloranfenicol<sup>67</sup>.

La sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas (SDFQ) es un mecanismo emergente. El principal mecanismo de resistencia a estas drogas en *H. influenzae* se debe a mutaciones puntuales en la región QRDR (*quinolone resistance-determining-region*) de la ADN girasa (genes *gyrA* y *gyrB*) y de la topoisomerasa IV (genes *parC* y *parE*). Ambas enzimas conforman los sitios blanco donde se unen estos antibióticos para inhibir la síntesis de proteínas. Las primeras mutaciones en el gen *gyrA* no son detectadas por el punto de corte del CLSI (sensible ≤ 1µg/ml) debido a que presentan CIM de ciprofloxacina de 0,12-1µg/ml, y solo se detectan por los puntos de corte cuando se suman mutaciones en el gen *parC* (CIM de ciprofloxacina ≥ 2 µg/ml). El ácido nalidíxico es un buen indicador de la SDFQ. La ausencia de

halos de inhibición en el antibiograma por difusión y valores de CIM  $\geq 4\mu\text{g/ml}$  se correlacionan con la presencia de las primeras mutaciones en el gen *gyrA* <sup>88</sup>.

*H. influenzae* posee resistencia intrínseca a macrólidos, lincosamidas, estreptograminas B y cetólidos debido a la presencia de una bomba de eflujo, lo que explica la limitada actividad de estos agentes frente a cepas salvajes <sup>107</sup>. La resistencia adquirida a macrólidos puede deberse a mutaciones en los genes de las proteínas ribosomales L4, L22 y en el ARNr 23S que impiden la unión del macrólido a su sitio de acción <sup>89</sup>. Recientemente, se encontraron aislamientos con resistencia a macrólidos mediada por mecanismos de protección ribosomal codificada por los genes *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)* y *erm(F)*, así como por una bomba de eflujo codificada por el gen *mef(A)* en pacientes con fibrosis quística <sup>95</sup>.

La resistencia a trimetoprima/sulfametoxazol en aislamientos de *H. influenzae* es común y es causada por un aumento en la producción de la enzima dihidrofolatorreductasa con menor afinidad por trimetoprima <sup>27</sup>.

Según datos del Programa de Vigilancia de Sensibilidad a los Antimicrobianos-SENTRY, para el período 1997-2001, la resistencia de *H. influenzae* en Latinoamérica era de 16,3% para ampicilina y de 0,3% para azitromicina. No se encontró resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico ni a quinolonas<sup>57</sup>. Datos de la Argentina, extraídos del Programa Nacional de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos WHONET, durante los años 2000-2009, muestran un promedio de 21% de resistencia a ampicilina mediada por  $\beta$ -lactamasa y alrededor de un 1% de aislamientos BLNAR, sin variaciones significativas a lo largo de los años (datos no publicados). Por otra parte, los datos del Programa SIREVA- Argentina (Sistema de Redes de Vigilancia de los Agentes Bacterianos Responsables de Neumonía y Meningitis), provenientes de aislamientos de *H. influenzae* obtenidos de muestras

invasivas durante 2009-2010, muestran un 16,5% de resistencia a ampicilina (enteramente mediada por  $\beta$ -lactamasa) y sólo se encontró un aislamiento BLPACR. En esta misma muestra se encontraron porcentajes de resistencia de 27% a trimetoprima/sulfametoxazol, 6,2% a cefaclor, 0,8% a amoxicilina/ácido clavulánico y 0,8% a cloranfenicol <sup>69</sup>. Si bien en las estadísticas nacionales no se evidencia resistencia a ciprofloxacina ni a azitromicina, se han publicado trabajos donde se registran aislamientos de *H. influenzae* y *H. parainfluenzae* con sensibilidad disminuida y resistencia a fluoroquinolonas <sup>24</sup> y se han confirmado en el Centro Nacional de Referencia aislamientos con resistencia a azitromicina (datos no publicados).

## Bibliografía

1. Adam H, Richardson S, Jamieson F, Rawte P, Low D, Fisman D. Changing epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* in Ontario, Canada: evidence for herd effects and strain replacement due to Hib vaccination. *Vaccine*. 2010; 28:4073-8.
2. American Academy of Pediatrics, Committee on Infectious Diseases. *Haemophilus influenzae*. En: Pickering LK editors. *Red Book: 2003 Report of the Committee on Infectious Diseases*, 26<sup>th</sup> edition. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics, 2003; p. 357-65.
3. Aparicio, P, Roman F, Campos J. Epidemiological characterization of *Haemophilus influenzae* using molecular markers. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1996; 14: 227-32.
4. Bandi V, Jakubowycz M, Kinyon C, Mason E, Atmar R, Greenberg S, Murphy T. Infectious exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease associated with respiratory viruses and non-typeable *Haemophilus influenzae*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003; 37: 69-75.
5. Barbour M, Mayon-White R, Coles C, Derrick W, Moxon E. The impact of conjugate vaccine on carriage of *Haemophilus influenzae* type b (Hib). *J Infect Dis*. 1995; 171: 93-8.



6. Bauer M, Goheen M, Townsend C, Spinola S. *Haemophilus ducreyi* associates with phagocytes, collagen, and fibrin and remains extracellular throughout infection of human volunteers. *Infect Immun*. 2001; 69: 2549-57.
7. Bauer M, Townsend C, Ronald A, Spinola S. Localization of *Haemophilus ducreyi* in naturally acquired chancroidal ulcers. *Microb Infect*. 2006; 8: 2465-8.
8. Bokermann S, Zanella R, Lemos A, De Andrade A, Brandileone M. Evaluation of methodology for serotyping invasive and nasopharyngeal isolates of *Haemophilus influenzae* in the ongoing surveillance in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 5546-50.
9. Breitkopf C, Hammel D, Scheld H, Peters G, Becker K. Impact of a molecular approach to improve the microbiological diagnosis of infective heart valve endocarditis. *Circulation*. 2005; 111:1415-21.
10. Brosnikoff R, Shokoples S, Barth Reller L, Mirrett S, Janda W, Ristow K, Krilcich A. Multicenter evaluation of the New Vitek 2 *Neisseria-Haemophilus* Identification Card. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 2681-5.
11. Bruant G, Watt S, Quentin R, Rosenau A. Typing of nonencapsulated *Haemophilus* strains by repetitive element sequence-based PCR using intergenic dyad sequences. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 3473-80.
12. Bruera M, Gallagher R, Hernández A, Stepanik D, Isasmendi A, Efron A, Cardigni G, Vázquez L. Meningitis por *Haemophilus influenzae* tipo e (Hie). II Congreso Internacional de Infectología Pediátrica y Vacunas, 2010, Resumen J28-28340. P 22. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
13. Campos J, Hernando M, Román F, Pérez-Vázquez M, Aracil B, Oteo J, Lázaro E, de Abajo F; Group of Invasive *Haemophilus* Infections of the Autonomous Community of Madrid, Spain. Analysis of invasive *Haemophilus influenzae* infections after extensive vaccination against *H. influenzae* type b. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 524-9.
14. Campos J, Román F, Pérez-Vázquez M, Aracil B, Oteo J, Cercenado E; Spanish Study Group for *H. influenzae* type f. Antibiotic resistance and clinical significance of *Haemophilus influenzae* type f. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 52: 961-6.

15. Campos J, Sáez-Nieto JA. Gram-negative infections: *Haemophilus* and other clinically relevant Gram negative cocobacilli. En: Cimolai N, editors. Laboratory Diagnosis of Bacterial Infections. Marcel Dekker, New York, NY, USA, 2001, p. 557-80.
16. Cardoso de Almeida A, Caldeira [http://jmm.sgmjournals.org/content/59/9/1132.short - aff-1](http://jmm.sgmjournals.org/content/59/9/1132.short-aff-1) N, Schroeder L, Batalha de Jesus A, Rodrigues Serradas L, da Costa [http://jmm.sgmjournals.org/content/59/9/1132.short - aff-2](http://jmm.sgmjournals.org/content/59/9/1132.short-aff-2) A, Lima CO, de Filippis I. Urinary tract infection caused by nontypable *Haemophilus influenzae* in the elderly. J Med Microbiol. 2010; 59 (Pt 9): 1132-3.
17. Center for Disease Control and Prevention. Progress toward eliminating *Haemophilus influenzae* type b disease among infants and children. United States, 1987-1993; 1994.
18. Chiba N, Murayama S, Morozumi M, Nakayama E, Okada T, Iwata S, Sunakawa K, Ubukata K. Rapid detection of eight causative pathogens for the diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR. J Infect Chemother. 2009; 15:92-8.
19. Christensen P, Kahlmeter G, Jonsson S, Kronvall G. New method for the serological grouping of streptococci with specific antibodies absorbed to protein-A containing staphylococci. Infect Immun. 1973; 7: 881-5.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Eleven Edition. 2012. M2-A11. Wayne, PA, EE.UU.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 22th informational supplement. 2012. M100-S22. Wayne, PA, EE.UU.
22. Corless C, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox A, Kaczmarek E. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. J Clin Microbiol. 2001; 39: 1553-8.
23. Corn P, Anders J, Takala A, Kayhty H, Hoiseith S. Genes involved in *Haemophilus influenzae* type b capsule expression are frequently amplified. J Infect Dis. 1993; 167: 356-64.
24. Corso A, Faccone D, Guerriero L, Pruscino L, Vázquez M, Andrés P, Errecalde L, Procopio A, Tokumoto M, Kaufman S, Galas M. Emergencia de aislamientos clínicos de *Haemophilus* spp. con sensibilidad reducida a fluoroquinolonas en la Argentina. Congreso SADEBAC de Bacteriología Clínica. Resumen O20 (114). Rev Argent Microbiol. 2006; 44 Supl 1:9.

25. Dangor Y, Ballard R, Exposto L, Fehler G, Miller S, Koornhof H. Accuracy of clinical diagnosis of genital ulcer disease. *Sex Transm Dis.* 1990; 17:184-9.
26. De Almeida A, de Filippis I, de Abreu A, Ferreira D, Gemal A, Marzochi K. Occurrence of *Haemophilus influenzae* strains in three Brazilian states since the introduction of a conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccine. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 777-81.
27. De Groot RD, Chaffin DO, Kuehn M, Smith AL. Trimethoprim resistance in *Haemophilus influenzae* is due to altered dihydrofolate reductase(s). *Biochem J.* 1991; 247 (Pt 3): 657-62.
28. Doern GV. In vitro susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*: review of new National Committee for Clinical Laboratory Standards recommendations. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 3035-8.
29. Doern GV, Jones RN. Antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988; 32: 1747-53.
30. Dominguez A, Bou R, Sánchez F, Fontanals D, Latorre C, Salleras L. A population-based study of *Haemophilus influenzae* invasive disease in Catalonia. *Vacunas.* 2002; 3: 3-7.
31. Efron A, Moscoloni M, Reijtman V, Regueira M. Vigilancia de serotipos en infecciones invasivas por *Haemophilus influenzae* en la Argentina en la era de la vacuna conjugada contra el serotipo b en el período 2005-2010. *Rev Argent Microbiol.* 2013; 45: 240-7.
32. Errecalde L, Corso A, Faccone D, Kaufman S. *Haemophilus* spp. Perfil de resistencia y *screening* de sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas. Congreso SADEBAC - División de la AAM - 25 aniversario - IV Actividad Científica Anual de la Sociedad Argentina de Bacteriología Clínica, 2006.
32. Faccone D, López Ruiti P, Vázquez M, Guerriero L, Lucero C, Gagetti P, Ceriana P, Corso A. Emergence of an *Haemophilus parainfluenzae* isolate with decreased susceptibility to cefotaxime plus fluoroquinolones. 51<sup>st</sup> Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2011. Resumen C2 1812. Chicago, Illinois, EE.UU.
33. Faden H. Meningitis caused by nontypable *Haemophilus influenzae* in a fourth-month-old infant. *Pediatric Infect Dis J.* 1991; 10: 254-5.

34. Faden H, Duffy A, Williams D, Kristofyk D, Wolf J. Epidemiology of nasopharyngeal colonization with non typeable *Haemophilus influenzae* in the first two years of life. *J Infect Dis.* 1995; 172: 132-5.
35. Falla T, Crook D, Brophy L, Maskell D, Kroll J, Moxon E. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 2382-6.
36. Falla T, Dobson S, Crook D, Kraak W, Nichols W, Anderson E, Jordens JZ, Slack MP, Mayon-White D, Moxon ER. Population-based study of non-typable *Haemophilus influenzae* invasive disease in children and neonates. *Lancet.* 1993; 341: 851-4.
37. Farrel DJ, Morrissey I, Bakker S, Buckridge S, Felmingham D. Global distribution of TEM-1 and ROB-1 beta-lactamases in *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 53: 773-6.
38. Figueira M, Ram S, Goldstein R, Hood D, Moxon E, Pelton S. Role of complement in defense of the middle ear revealed by restoring the virulence of nontypeable *Haemophilus influenzae* *siaB* mutants. *Infect Immun.* 2007; 75: 325-33.
39. Forbes K, Bruce K, Ball A, Pennington T. Variation in length and sequence of porin (omp2) alleles of noncapsulate *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol.* 1992; 6:2107-12.
40. Forleo-Neto E, de Oliveira C, Maluf C, Bataglin C, Araujo J, Kunz L, Jr., Pustai AK, Vieira VS, Zanella RC, Brandileone MC, Mimica LM, Mimica IM. Decreased point prevalence of *Haemophilus influenzae* type b oropharyngeal colonization by mass immunization of Brazilian children less than 5 years of age with Hib polyribosylribitol phosphate polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine in combination with diphtheria-tetanus-toxoids-pertussis vaccine. *J Infect Dis.* 1999; 180: 1153-8.
41. Forsgren A, Riesbeck K, Janson H. Protein D of *Haemophilus influenzae*: a protective non-typeable *H. influenzae* antigen and a carrier for pneumococcal conjugate vaccines. *Clin Infect Dis.* 2008; 46: 726-31.
42. García-Cobos S, Campos J, Lázaro E, Román F, Cercenado E, García-Rey C, Pérez-Vázquez M, Oteo J, de Abajo F. Ampicillin-resistant non- $\beta$ -lactamase-producing *Haemophilus influenzae* in Spain: recent emergence of clonal isolates with increased resistance to cefotaxime and cefixime. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51: 2564-73.

43. Gilsdorf J. Antigenic diversity and gene polymorphisms in *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*. 1998; 66: 5053-9.
44. Gryngarten M, Escobar M, Turco M. Vulvovaginitis en niñas y adolescentes: agentes patógenos más frecuentes. *Revista Hospital de Niños, Buenos Aires*. 2003; 45: 75-80.
45. Hallström T, Blom A, Zipfel P, Riesbeck K. Nontypeable *Haemophilus influenzae* protein E binds vitronectin and is important for serum resistance. *J Immunol*. 2009; 183: 2593-601.
46. Hallström T, Riesbeck K. *Haemophilus influenzae* and the complement system. *Trends Microbiol*. 2010; 18: 258-65.
47. Hallström, T, Trajkovska E, Forsgren A, Riesbeck K. *Haemophilus influenzae* surface fibrils contribute to serum resistance by interacting with vitronectin. *J Immunol*. 2006; 177: 430-6
48. Harper J, Tilse M. Biotypes of *Haemophilus influenzae* that are associated with noninvasive infections. *J Clin Microbiol*. 1991; 29: 2539-42.
49. Harrison L, Simonsen V, Waldman E. Emergence and disappearance of a virulent clone of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius*, cause of Brazilian purpuric fever. *Clin Microbiol Rev*. 2008; 21: 594-605.
50. Harrison O, Bruggemann A, Caugant D, van der Ende A, Frosch M, Gray S, Heuberger S, Krizova P, Olcen P, Slack M, Taha M, Maiden M. Molecular typing methods for outbreak detection and surveillance of invasive disease caused by *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*, a review. *Microbiol*. 2011; 157: 2181-95.
51. Hoban D, Felmingham D. The PROTEKT surveillance study: antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from community-acquired respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 50 (Suppl. S1): 49-59.
52. Hobson R, Williams A, Rawal K, Pennington T, Forbes K. Incidence and spread of *Haemophilus influenzae* on an Antarctic base determined using the polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect*. 1994;114:93-103.
53. Hotomi M, Kono M, Togawa A, Arai J, Takei S, Ikeda Y, Ogami M, Murphy TF, Yamanaka N. *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* in tonsillar cultures of adults with acute pharyngotonsillitis. *Auris Nasus Larynx*. 2010; 37: 594-600.

54. Jacobs MR, Bajaksouzian S, Windau A, Appelbaum PC, Lin G, Felmingham D, Dencer C, Koeth L, Singer ME, Good CE. Effects of various test media on the activities of 21 antimicrobial agents against *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol. 2002; 40: 3269-76.
55. Jin Z, Romero-Steiner S, Carlone G, Robbins J, Schneerson R. *Haemophilus influenzae* type a infection and its prevention. Infect Immun. 2007; 75:2650-4.
56. Johnson DM, Sader HS, Fritsche TR, Biedenbach DJ, Jones RN. Susceptibility trends of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* against orally administered antimicrobial agents: five-year report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003; 47: 373-6.
57. Jorgensen JH, Redding JD, Maher LA, Howell AW. Improved medium for antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol. 1987; 25: 2105-13.
58. Killian M. A Taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. J Gen Microbiol. 1976; 93: 9-62.
59. Killian M. *Haemophilus*. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of Clinical Microbiology, 9th edition. Washington DC, ASM Press, 2007, p. 636-48.
60. Kroll J, Hopkins I, Moxon E. Capsule loss in *H. influenzae* type b occurs by recombination mediated disruption of a gene essential for polysaccharide export 1988; Cell. 53:347-56.
61. Kroll J, Loynds B, Brophy L, Moxon E. The *bex* locus in encapsulated *Haemophilus influenzae*: a chromosomal region involved in capsule polysaccharide export. Mol Microbiol. 1990; 4:1853-62.
62. Kroll J, Moxon E, Loynds B. An ancestral mutation enhancing the fitness and increasing the virulence of *Haemophilus influenzae* type b. J Infect Dis. 1993; 168:172-6.
63. Kroll J, Zamze S, Loynds B, Moxon R. Common organization of chromosomal loci for production of different capsular polysaccharides in *Haemophilus influenzae*. J Bacteriol. 1989; 171: 3343-7.
64. Ledebor NA, Doern GV. *Haemophilus*. En: Versalovic J, Carroll KC, Funke C, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. Manual of Clinical Microbiology, 10<sup>th</sup> edition. Washington DC, ASM Press, 2011, p. 588-602.

65. Leslye L, LaClaire L, Tondella M, Beall B, Noble C, Raghunathan P, Rosenstein N, Popovic T and Active Bacterial Core Surveillance Team Members. Identification of *Haemophilus influenzae* serotypes by standard slide agglutination serotyping and PCR-based capsule typing. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 393-6.
66. Levy J, Verhaegen G, De Mol P, Couturier M, Dekegel D, Butzler JP. Molecular characterization of resistance plasmids of epidemiologically unrelated strains of multiresistant *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis.* 1993; 168: 177-87.
67. Lima J, Ribeiro G, Cordeiro S, Gouveia E, Salgado K, Spratt B, Godoy D, Reis M, Ko A, Reis J. Poor clinical outcome for meningitis caused by *Haemophilus influenzae* serotype a strains containing the IS1016-*bexA* deletion. *J Infect Dis.* 2010; 202: 1577-84.
68. Lucero C, Efron A, Guerriero L, Ceriana P, Veliz, O, Regueira M, Red SIREVA, Corso A. Estado actual de la de la prevalencia de serotipos y resistencia a los antimicrobianos de *Haemophilus influenzae* aislados de infecciones invasivas. VII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas- SADEBAC. Resumen O20 (114). *Rev Argent Microbiol.* 2012; 44 Supl 1: 9.
69. Maaroufi Y, De Bruyne JM, Heymans C, Crokaert F. Real-time PCR for determining capsular serotypes of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 2305-8.
70. Martin M, Casellas J, Madhi S, Urquhart T, Delport S, Ferrero F, Chamany S, Dayan G, Rose C, Levine O, Klugman K, Feikin D. Impact of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in South Africa and Argentina. *Pediatr Infect Dis J.* 2004; 23: 842-7.
71. Mendelman PM. *Haemophilus influenzae*. En: Feigin RD, Cherry JD, editors. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, 3rd edition. Filadelfia: WB Saunders, 1992, p. 1117-40.
72. Mohle-Boetani J, Ajello G, Breneman E, Deaver K, Harvey C, Plikaytis B, Farley M, Stephens D, Wenger J. Carriage of *Haemophilus influenzae* type b in children after widespread vaccination with conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 1993; 12: 589-93.
73. Morse S. Chancroid and *Haemophilus ducreyi*. *Clin Microbiol Rev.* 1989; 2:137-57.
74. Morse S, Trees D, Htun Y, Radebe F, Orle K, Dangor Y, Beck-Sague CM, Schmid S, Fehler G, Weiss JB, Ballard RC. Comparison of clinical diagnosis and standard laboratory and

- molecular methods for the diagnosis of genital ulcer disease in Lesotho: association with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis.* 1997; 175:583-9
75. Munson E, Doern G. Comparison of three commercial test systems for biotyping *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae*. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 4051-3.
  76. Murphy T. *Haemophilus* infections. En: Mandell G, Bennett J, Dolin R, editors. Principles and Practices of Infectious Diseases, 6<sup>th</sup> edition, vol. 2. Elsevier, Philadelphia, PA, 2005, p. 2661-9.
  77. Murphy T. Respiratory infections caused by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Curr Opin Infect Dis.* 2003; 16: 129-34.
  78. Murphy T, Brauer A, Schiffmacher A, Sethi S. Persistent colonization by *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 170: 266-72.
  79. Murphy T, Faden H, Bakaletz LO, Kyd J, Forsgren A, Campos J, Virji M, Pelton S. Nontypeable *Haemophilus influenzae* as a pathogen in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2009; 28: 43-8.
  80. Murphy T, Kirkham C, Lesse A. Construction of a mutant and characterization of the role of the vaccine antigen P6 in outer membrane integrity of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun.* 2007; 74: 5169-76.
  81. Nørskov-Lauritsen N, Brun B, Killian M. Multilocus sequence phylogenetic study of the genus *Haemophilus* with description of *Haemophilus pittmaniae* sp. nov. *Int J System Evol Microbiol.* 2005; 55: 449-56.
  82. Nørskov-Lauritsen N, Killian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov. comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006; 56: 2135-46.
  83. Parra E, Castañeda E, Moreno J. Identificación de *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* por reacción en cadena de la polimerasa. *Biomédica.* 2007; 27: 454-60.



84. Peerbooms P, Engelen M, Stokman D, van Benthem B, van Weert M, Bruisten S, van Belkum A, Coutinho R. Nasopharyngeal carriage of potential bacterial pathogens related to day care attendance, with special reference to the molecular epidemiology of *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol. 2002; 40: 2832-6.
85. Peltola H, Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. Clin Microbiol Rev. 2000; 13: 302-17.
86. Pennekam A, Zbinden R, von Graevenitz A. Detection of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* from body fluids in blood culture bottles. J Microbiol Methods. 1996; 25: 303-7.
87. Pérez-Vázquez M, Román F, Aracil B, Cantón R, Campos J. Laboratory detection of *Haemophilus influenzae* with decreased susceptibility to nalidixic acid, ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin due to *gyrA* and *parC* mutations. J Clin Microbiol. 2004; 42: 1185-91.
88. Peric M, Bozdogan B, Jacobs MR, Appelbaum PC. Effects of an efflux mechanism and ribosomal mutations on macrolide susceptibility of *Haemophilus influenzae* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47: 1017-22.
89. Pillay A, Hoosen A, Loykissonlal D, Glock C, Odhav B, Sturm A. Comparison of culture media for the laboratory diagnosis of chancroid. J Med Microbiol. 1998; 47: 1023-6.
90. Pittman, M. Variation and type specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae*. J Exp Med. 1931; 53: 471-92.
91. Rare Organism Club. bioMérieux, Inc, 2007.
92. Raymond J, Armand-Lefevre L, Moulin F, Dabernat H, Commeau A, Gendrel D, Berche P. Nasopharyngeal colonization by *Haemophilus influenzae* in children living in an orphanage. Pediatr Infect Dis J. 2001; 20: 779-84.
93. Raymond S, Mubareka S, Michelle L, Wylie J, Stuart S, Law D. Invasive *Haemophilus influenzae* in Manitoba, Canada, in the postvaccination era. J Clin Microbiol. 2006; 44: 1530-5
94. Roberts M, Soge O, No D. Characterization of macrolide resistance genes in *Haemophilus influenzae* isolated from children with cystic fibrosis. J Antimicrob Chemother. 2011; 66: 100-4.

95. Romanin V, Chiavetta L, Salvay M, Chiolo M, Regueira M, Barrios A, Califano G, García S, Gentile A. Vacuna anti-*Haemophilus influenzae* de tipo b (Hib) en el Calendario Nacional de Argentina: portación nasofaríngea de Hib tras ocho años de su introducción. Arch Pediatr Urug. 2009; 80: 51-9.
96. Sacchi T, Fukasawa O, Goncalves M, Salgado M, Shutt K, Carvalhanas T, Ribeiro A, Kemp B, Gorla M, Albernaz R, Marques E, Cruciano A, Waldman E, Brandileone M, Harrison L, São Paulo RT-PCR, Surveillance Project Team. Incorporation of Real-Time PCR into routine public health surveillance of culture negative bacterial meningitis in Sao Paulo, Brazil. PLoS ONE 2011; 6: 1-8.
97. Saito M, Umeda A, Yoshida S. Subtyping of *Haemophilus influenzae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol. 1999; 37: 2142-7.
98. Saldaño Gómez A, Orlando N, Céccoli C, Procopio A, López. Brain abscess due to *Haemophilus aphrophilus*. Report of two cases. 3<sup>rd</sup> World Congress of Pediatric Infectious Diseases. WSPID, 2002, Resumen p. 63, Santiago, Chile.
99. Sanbongi Y, Suzuki T, Osaki Y, Senju N, Ida T, Ubukata K. Molecular evolution of beta-lactam-resistant *Haemophilus influenzae*: 9-year surveillance of penicillin-binding protein 3 mutations in isolates from Japan. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50: 2487-92.
100. Schouls L, van der Ende A, van de Pol I, Schot C, Spanjaard L, Vauterin P, Wilderbeek D, Witteveen S. Increase in genetic diversity of *Haemophilus influenzae* serotype b (Hib) strains after introduction of Hib vaccination in The Netherlands. J Clin Microbiol. 43: 2741-9.
101. Sethi S, Murphy T. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. N Engl J Med. 2008; 359: 2355-65.
102. Slack M, Azzopardi H, Hargreaves R, Ramsay E. Enhanced surveillance of invasive *Haemophilus influenzae* disease in England, 1990 to 1996: impact of conjugate vaccines. Pediatr Infect Dis J. 1998; 17: S204-7.
103. Spinola S, Bauer M, Munson S Jr. Immunopathogenesis of *Haemophilus ducreyi* infection (chancroid). Infect Immun. 2002; 70: 1667-76.

104. Sukupolvi-Petty S, Grass S, StGeme J. The *Haemophilus influenzae* type b *hcsA* and *hcsB* gene products facilitate transport of capsular polysaccharide across the outer membrane and are essential for virulence. *J Bacteriol.* 2006; 188: 3870-7.
105. Taller Red Meningitis e Infecciones Respiratorias Agudas Bacterianas. INEI ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán. Mayo 2010. Mar del Plata. Argentina.
106. Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20: 368-89.
107. Tristram S, Pitout MJ, Forward K, Campbell S, Nichols S, Davidson RJ. Characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing isolates of *Haemophilus parainfluenzae*. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61: 509-14.
108. Tzanakaki G, Tsopanomichalou M, Kesanopoulos K, Matzourani R, Sioumala M, Tabaki A, Kremastinou J. Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11:386-90.
109. Wang X, Theodore J, Mair R, Trujillo-Lopez E, du Plessis M, Wolter N, Bayghman A, Hatcher C, Vuong J, Lott L, von Gottberg A, Sacchi C, McDonald M, Messonier N, Mayer L. Clinical validation of multiplex Real-Time assays for detection of bacterial pathogens. *J Clin Microbiol.* 2012; 50:702-8.

## **Capítulo II.c.4.2**

### **Bacilos gram negativos del grupo HACEK (ACEKS) y microorganismos relacionados**

#### **CARLOS A. VAY**

Profesor Asociado de Microbiología Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica.  
Universidad de Buenos Aires.

Jefe Laboratorio de Bacteriología Departamento de Bioquímica Clínica. Hospital de  
Clínicas "Gral. José de San Martín"

Director Carrera de Especialización en Bacteriología Clínica. Facultad de Farmacia y  
Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

#### **MARISA N. ALMUZARA**

Jefe de Trabajos Prácticos Microbiología Clínica. Facultad de Farmacia y  
Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

Docente Carrera de Especialización en Bacteriología Clínica. Facultad de  
Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Jefe Laboratorio de Bacteriología Hospital Interzonal General de Agudos Eva Perón.  
Provincia de Buenos Aires.

## Introducción

El grupo HACEK (ACEKS) está integrado por bacilos o cocobacilos gram negativos que crecen lentamente en los medios de cultivo enriquecidos como el agar tripteína de soja o agar Columbia con sangre o el agar chocolate y cuyo crecimiento se estimula con exceso de CO<sub>2</sub> atmosférico, razón por la cual se los incluye dentro de los “microorganismos exigentes”. Todos ellos forman parte de la microbiota habitual de las mucosas orofaríngea y urogenital y fueron identificados inicialmente como agentes de endocarditis, aunque en la actualidad se conoce muy bien su participación en otras localizaciones infecciosas diferentes. La sigla incluye: *Haemophilus aphrophilus* (actualmente *Aggregatibacter aphrophilus*), *Haemophilus paraphrophilus* (actualmente dentro de la especie *Aggregatibacter aphrophilus*), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (actualmente *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), *Cardiobacterium* spp., *Eikenella corrodens* y *Kingella* spp. Si le sumamos una S podemos incluir a *Suttonella indologenes*.

Sin embargo otros bacilos gram negativos distintos de los mencionados también se incluyen con los microorganismos exigentes entre los que cabe mencionar por su capacidad de infectar al hombre a *Capnocytophaga*, *Dysgonomonas*, *Pasteurella*, *Actinobacillus*, *Simonsiella* y *Streptobacillus*, entre los más frecuentes.

## Aspectos taxonómicos

### ***Haemophilus, Actinobacillus y Pasteurella***

Los géneros *Haemophilus*, *Actinobacillus* y *Pasteurella* se incluyen en la familia *Pasteurellaceae*. Recientemente, estudios basados en la secuenciación del gen *rRNA* 16S y en la hibridación ADN-ADN han demostrado que *A. actinomycetemcomitans*, *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus* y *Haemophilus segnis* forman un grupo monofilogenético y se ha propuesto la inclusión de los mismos en el género *Aggregatibacter* dentro de la familia *Pasteurellaceae*<sup>62</sup>. Asimismo, *A. aphrophilus* incluye los microorganismos antiguamente designados como *H. aphrophilus* y *H. paraphrophilus*, estos últimos considerados como aislamientos de *A. aphrophilus* dependientes del factor V para su crecimiento<sup>62</sup>.

### ***Cardiobacterium***

El género *Cardiobacterium* se incluye en la familia *Cardiobacteriaceae* y comprende solo 2 especies: *Cardiobacterium hominis* y *Cardiobacterium valvarum*

30

### ***Eikenella y Kingella***

*Eikenella*, forma parte de la familia *Neisseriaceae* e incluye una sola especie: *Eikenella corrodens*<sup>26</sup>. En la misma familia se halla incluido el género *Kingella* con 4 especies: *Kingella kingae*, *Kingella denitrificans*, *Kingella oralis* y *Kingella potus*<sup>26</sup>.

## ***Pasteurella***

El género *Pasteurella* comprende especies animales y otras que pueden producir infecciones humanas por contacto con éstos o no. En este capítulo trataremos solo las especies que pueden afectar al hombre y particularmente *Pasteurella multocida* con sus dos subespecies *P. multocida* subsp. *multocida* (la más frecuente), *P. multocida* subsp. *gallicida* y *P. multocida* subsp. *septica*. *Pasteurella canis*, *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella pneumotropica* y *Pasteurella stomatis* son otras especies a considerar<sup>86</sup>.

Del género *Pasteurella* se desprendieron otros como *Mannheimia* y *Bibersteinia*<sup>7, 61</sup>

## ***Capnocytophaga***

El género *Capnocytophaga*, perteneciente a la familia *Flavobacteriaceae*; a grandes rasgos comprende dos grupos de bacilos gram negativos de difícil crecimiento previamente conocidos como grupos DF-1 y DF-2 del CDC. En total son 9 especies: *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga sputigena* (ex-DF-1), *Capnocytophaga canimorsus* y *Capnocytophaga cynodegmi* (ex-DF-2 y DF-2-like respectivamente) y más recientemente a *Capnocytophaga haemolytica*, *Capnocytophaga granulosa*, *Capnocytophaga leadbetteri* y a la geno especie AHN8471<sup>25,92</sup>.

## **Dysgonomonas**

El género *Dysgonomonas* (familia *Porphyromonadaceae*) consiste en bacilos gram negativos, inmóviles y anaerobios facultativos<sup>26</sup>. Se han descrito 4 especies: *Dysgonomonas gadei*<sup>33</sup>, *Dysgonomonas capnocytophagoides*<sup>33</sup>, *Dysgonomonas mossii*<sup>48</sup> y *Dysgonomonas hofstadii*<sup>47</sup>.

## **Streptobacillus**

*Streptobacillus*, (familia *Fusobacteriaceae*), consiste en una sola especie de bacilos gram negativos, inmóviles y anaerobios facultativos: *Streptobacillus moniliformis*<sup>26</sup>.

## **Suttonella**

El género *Suttonella* (familia *Cardiobacteriaceae*)<sup>26</sup>, incluye una sola especie: *Suttonella indologenes* (antiguamente *Kingella indologenes*)<sup>22</sup>.

## **Hábitat e impacto clínico**

Las bacterias del grupo HACEK y los microorganismos relacionados forman parte de la microbiota habitual de las mucosas de los seres humanos y otros animales<sup>92</sup>. En general son de baja virulencia y excepto aquellas especies (ej. *A. actinomycetemcomitans*) asociadas con infecciones periodontales, solamente



ocasionan infecciones en el hombre cuando pueden alcanzar sitios estériles luego de traumatismos tales como mordeduras humanas o de animales, manipulación de la cavidad oral o simplemente cuando acceden al torrente sanguíneo a través de la mucosa en mal estado, como ocurre en pacientes con mucositis.

El espectro de infecciones por estas bacterias se extiende desde la periodontitis hasta la endocarditis. De las bacterias del grupo HACEK, *A. aphrophilus*, *A. actinomycetemcomitans* y *C. hominis* son las que más frecuentemente se asocian con endocarditis, la que puede ocurrir sobre válvulas nativas o protésicas. Rara vez se ha descrito a *Cardiobacterium* como agente etiológico de otra enfermedad infecciosa diferente de la endocarditis, aunque recientemente, *C. hominis* ha sido implicado en pericarditis<sup>45</sup>, peritonitis asociada a diálisis peritoneal continua ambulatoria<sup>6</sup> y como causa de sepsis neonatal<sup>80</sup>.

En distintas y amplias series en donde se consigna la etiología de la endocarditis, entre el 3 y el 5 % de los casos son atribuibles a microorganismos del grupo HACEK. En el Estudio sobre Endocarditis Infecciosa en la República Argentina (EIRA-2) sobre un total de 470 pacientes con diagnóstico de endocarditis infecciosa (390 definitivos y 80 probables), el 6,1% de los casos fueron producidos por este grupo de microorganismos<sup>24</sup>. En cuanto a la evolución clínica, la endocarditis por bacterias del grupo HACEK, suele ser subaguda y es frecuente la embolia. La prevalencia global de embolia vinculada a la endocarditis producida por HACEK oscila entre 28 y 71%, según la serie. En las ecografías se observan por lo general grandes vegetaciones en el 85% de los pacientes, aunque el tamaño no es proporcional al riesgo de la embolia.

Es de interés destacar que en algunas oportunidades los microorganismos del grupo HACEK se han asociado con endocarditis mixtas (por lo general con

*Staphylococcus aureus*) en pacientes drogadictos endovenosos, puesto que es habitual que los mismos disuelvan droga en saliva. En estos casos vale resaltar la necesidad de informar al laboratorio este hecho, pues el crecimiento rápido de los estafilococos, puede enmascarar el desarrollo demorado de estas bacterias y con ello dilatar la instauración del tratamiento adecuado.

### ***Aggregatibacter***

*A. aphrophilus* (*H. aphrophilus* y *H. paraphrophilus*) y *Haemophilus parainfluenzae* son las especies más relacionadas con la endocarditis infecciosa<sup>14</sup>. Integran los microorganismos correspondientes a la letra H del grupo HACEK cuando se aplica el criterio de Duke a la hora de establecer el diagnóstico de endocarditis infecciosa. Son parte de la microbiota del tracto respiratorio superior y se hallan comúnmente en la placa dental. No son patógenos primarios en la enfermedad periodontal. Causan infecciones de cabeza y cuello, incluyendo el absceso cerebral<sup>56</sup>. Éstas se adquieren por extensión a partir de la cavidad oral. Infecciones como endocarditis, osteomielitis vertebral, artritis, meningitis y absceso cerebral, ocurren por diseminación hematógena. La fascitis necrotizante ha sido descrita como consecuencia de la drogadicción endovenosa.

*A. aphrophilus* es la especie que con más frecuencia se ha relacionado con endocarditis en individuos de mediana edad. La embolización arterial es la complicación más frecuente<sup>12</sup>.

Solo 21 casos de endocarditis por *A. aphrophilus* dependiente de NAD (previamente *H. paraphrophilius*) han sido informados. Ocurrieron en pacientes con

válvulas cardíacas anómalas y el prolapso de la válvula mitral fue con frecuencia la condición predisponente <sup>12</sup>.

*H. parainfluenzae* se ha comunicado como agente de endocarditis infecciosa en 66 casos en una revisión extensa publicada en el año 2001 <sup>12</sup>. Unos pocos casos han sido comunicados posteriormente en la literatura <sup>16, 49, 63</sup>. Ocurre en pacientes con enfermedad cardíaca previa y la endocarditis protésica representó el 10% de los casos. También la válvula mitral fue la más afectada. El 10% de las endocarditis por *H. parainfluenzae* era polimicrobiana <sup>12</sup>.

*A. actinomycetemcomitans* es también un comensal de la cavidad oral humana, aunque se lo ha relacionado con enfermedad periodontal grave y destructiva, caracterizada por la pérdida del hueso alveolar de molares e incisivos, tanto en niños como en adultos.

Se lo ha identificado en tejidos blandos y abscesos, en particular de cabeza y cuello. Se lo ha aislado junto a *Actinomyces israelii* a partir de especímenes purulentos actinomicóticos en el 30 % de los casos (de allí su nombre) <sup>62</sup>. Sin embargo, también otros microorganismos del grupo HACEK se pueden asociar con especies de *Actinomyces*. Ejemplo de ello son las infecciones relacionadas a dispositivos intrauterinos (DIU), en las que, además de una especie de *Actinomyces*, se aisló *E. corrodens*.

*A. actinomycetemcomitans* es la especie del grupo HACEK que más frecuentemente causa endocarditis infecciosa. Hasta el año 2001, 93 casos fueron comunicados en la literatura. En los últimos años, otros casos más han sido publicados <sup>66, 69</sup>. En una oportunidad el diagnóstico se logró únicamente mediante PCR sobre el tejido valvular de un paciente con diagnóstico de endocarditis y hemocultivos negativos <sup>84</sup>.

Alrededor del 50% de los pacientes con endocarditis por *A. actinomycetemcomitans* presentaron enfermedad dental y ellos eran individuos jóvenes o de mediana edad. La enfermedad cardíaca previa fue hallada en el 70% de los pacientes. El 28% requirió el reemplazo de la válvula<sup>12</sup>.

Otras infecciones por *A. actinomycetemcomitans* son similares a las que produce *A. aphrophilus*.

### ***Actinobacillus***

Las verdaderas especies de *Actinobacillus* ocasionalmente infectan al hombre. Algunas de ellas, en el pasado, habían sido consideradas como especies de *Pasteurella*. Hay especies que pertenecen a la microbiota de la mucosa oral de animales como el caballo y pueden producir infección en el hombre relacionada con la mordedura de estos animales. *Actinobacillus ligneresii*, *Actinobacillus equuli* y *Actinobacillus suis*, son las especies animales y *Actinobacillus ureae* y *Actinobacillus hominis* son exclusivamente humanas.

La especie *Actinobacillus ureae* es la que más frecuentemente infecta al hombre (descontando *A. actinomycetemcomitans*, que ya no pertenece al género). Se desconoce su hábitat natural, pero ha estado implicada en infecciones del tracto respiratorio<sup>64</sup>, bacteriemia, meningitis<sup>21</sup> y úlcera de córnea<sup>79</sup>. La meningitis es una de las enfermedades infecciosas más descritas por *A. ureae* y ocurre con mayor frecuencia en pacientes con traumatismo de cráneo y alcohólicos<sup>21</sup>.

## **Cardiobacterium**

*C. hominis* ha sido causa de 76 casos de endocarditis informados hasta el año 2001<sup>14</sup>. Se destaca su capacidad de lesionar la válvula aórtica, a diferencia de los otros miembros del grupo HACEK. Otra especie también implicada en endocarditis infecciosa es *C. valvarum*<sup>30</sup>.

## **Simonsiella**

Pertenece a la familia *Neisseriaceae*. La única especie aislada de seres humanos es *Simonsiella muelleri*.

Las bacterias de este género son bacilos gram negativos aerobios estrictos, filamentosos, con movilidad deslizante. Su hábitat es la cavidad oral de vertebrados de sangre caliente, incluyendo al hombre<sup>85</sup>.

Hasta el momento se desconoce su rol patológico en humanos.

## **Suttonella**

Pertenece a la familia *Cardiobacteriaceae*. Muy pocas comunicaciones describen las infecciones producidas por *Suttonella indologenes*. En nuestra experiencia fue reconocida como el agente causal de una úlcera de córnea en un paciente con pénfigo ocular<sup>5</sup>.

## ***Eikenella***

*Eikenella corrodens* es el más frecuente de los microorganismos del grupo HACEK en nuestra casuística local, aunque la literatura menciona en este lugar a *A. aphrophilus*.

Las infecciones más frecuentes son las de tejidos blandos de cabeza y cuello en donde a menudo se la encuentra junto con otros microorganismos. Se han relacionado con mordedura humana o heridas por puñetazo, las que pueden alcanzar el tejido óseo. Infecciones de tejidos blandos como celulitis se han asociado con la drogadicción endovenosa por la disolución de droga en saliva o la lubricación de agujas con este fluido biológico. La infección pulmonar se ha relacionado con inmunosupresión, aspiración de secreciones de las vías respiratorias o con la presencia de enfermedades pulmonares que ocasionan una disminución de los mecanismos locales de defensa. Por extensión de la infección periodontal, del oído medio, o infección sinusal, *Eikenella* puede ingresar al sistema nervioso central y causar meningitis, absceso cerebral o paraespinal y empiema subdural<sup>75</sup>. Es, además, uno de los agentes más frecuentes de la tiroiditis bacteriana aguda, hecho que fue detectado en nuestro medio en un paciente pediátrico con persistencia de la fístula del seno piriforme<sup>38</sup>.

También puede ser aislada de especímenes abdominales como abscesos abdominales<sup>59</sup>, pancreáticos y esplénicos y líquido peritoneal<sup>53</sup>. La infección ginecológica también puede ocurrir por este agente, en particular asociada con DIU. Se la ha aislado en varios casos como parte de flora mixta en casos pediátricos de otitis media crónica o aguda recurrente<sup>51</sup>

La infección urinaria por *E. corrodens* en pediatría ha sido descrita en la Argentina en un niño con uronefrosis bilateral y síndrome de “*prune belly*”<sup>52</sup>. Recientemente se ha presentado un caso similar en un geronte.

La endocarditis por *Eikenella* fue descrita en 19 pacientes de la literatura internacional hasta el año 2001<sup>12</sup>. Sólo 4 casos más han sido comunicados en los años subsiguientes<sup>13, 31, 55, 83</sup>.

## ***Kingella***

*Kingella kingae* es la especie prevalente del género *Kingella*. Debido a la implementación de técnicas modernas en los laboratorios clínicos se la ha reconocido con mayor frecuencia en especímenes clínicos, en particular en líquidos articulares y se ha registrado un aumento de publicaciones al respecto en Europa, Australia y América. En una serie actual, *K. kingae* fue la causa de casi el 50% de las infecciones osteoarticulares en niños israelíes menores de dos años, que habían sido vacunados para *Haemophilus influenzae* tipo b<sup>87</sup>. Sin embargo, en nuestro medio es menos frecuente<sup>28</sup> y los estafilococos continúan siendo el agente causal más común de artritis en niños menores de dos años. Los niños con artritis por *K. kingae* mostraron fiebre en el 84% de los casos.

Un estudio demostró que más del 70% de los niños pequeños estaban colonizados con *K. kingae* al menos una vez al año y que esta bacteria era capaz de persistir en su tracto respiratorio durante al menos 2 meses. Se transmite de niño a niño a través de la saliva, por las secreciones respiratorias y por contacto oral con

objetos contaminados, y atraviesa las barreras mucosas cuando éstas se debilitan debido a infecciones respiratorias o estomatitis<sup>41</sup>.

La patogenia de *K. kingae* fue recientemente atribuida a la producción de una potente citotoxina, conocida como RTX. Esta toxina tiene actividad sobre una amplia variedad de tipos de células humanas y puede jugar algún rol en la colonización del tracto respiratorio, en la invasión sistémica y en la producción de daño en las articulaciones<sup>41</sup>.

La bacteriemia oculta fue la presentación clínica más común luego de la osteoarticular en una serie de 85 casos de infecciones por *K. kingae* ocurridas en pacientes pediátricos entre 1988-2003 en Israel<sup>87</sup>.

La bacteriemia puede presentarse con exantema petequial similar al que ocurre durante la sepsis por *Neisseria meningitidis*. La bacteriemia por *K. kingae* se vincula con infecciones virales del tracto respiratorio superior, las que debilitan las mucosas y facilitan el acceso del microorganismo a la sangre.

La endocarditis puede ocurrir en adultos y en niños mayores con valvulopatía de base o con prótesis valvular. La bacteriemia sin endocarditis suele presentarse en individuos adultos con enfermedades de base como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoidea, diabetes, trasplante de riñón, cáncer, leucemia y sida.

También se han comunicado casos de espondilodiscitis, meningitis, abscesos, endoftalmítis, úlceras corneales, epiglotitis y neumonía<sup>28, 42, 46, 54, 90</sup>.



## ***Capnocytophaga***

Las bacterias del género *Capnocytophaga* son habitantes de la mucosa oral del hombre y de animales. Las especies que no muestran actividad de catalasa (*C. gingivalis*, *C. sputigena*, *C. ochraceae*, *C. haemolytica* y *C. granulosa*), forman parte de la microbiota de la mucosa oral humana, mientras que las que son catalasa positivas (*C. cynodegmi* y *C. canimorsus*) se hallan en la mucosa de animales, principalmente del perro.

Las especies humanas causan predominantemente bacteriemia en pacientes neutropénicos, peritonitis, endoftalmitis, infecciones de piel y partes blandas y endocarditis entre otras<sup>8</sup>. Las de la mucosa oral del perro se asocian con bacteriemia en pacientes esplenectomizados o alcohólicos tras la mordedura o arañazo de perros o gatos<sup>39</sup>.

## ***Dysgonomonas***

El hábitat natural de las especies de *Dysgonomonas* es desconocido. Se han aislado de pacientes inmunocomprometidos con diarrea buscando campilobacterias<sup>57</sup>. Su rol en esta enfermedad infecciosa es incierto. En pocas ocasiones se comunicaron casos de bacteriemia. Dos de ellas ocurrieron, una a partir de un foco biliar en un paciente con cáncer de la vía biliar y el otro durante la hemodiálisis<sup>2</sup>.

## ***Leptotrichia***

Algunas especies aerotolerantes de *Leptotrichia* pueden ocasionar bacteriemias a partir de las lesiones de las mucosa oral o gastrointestinal (mucositis) de pacientes neutropénicos. Neumonía grave, artritis séptica y meningitis neonatal son algunas de las infecciones descritas en la literatura<sup>32</sup>.

Su habitat natural es la mucosa gastrointestinal y genitourinaria del hombre. Su inclusión en este capítulo obedece a que su semejanza morfológica con *Capnocytophaga* spp. podría conducir a errores diagnósticos.

## ***Pasteurella***

*Pasteurella* spp. están dentro de los agentes más frecuentemente involucrados en las infecciones por mordedura de animales. En infecciones por mordedura de perro diversas investigaciones demuestran que la especie más frecuente es *P. canis* a diferencia de los que ocurre con la mordedura o arañazo de gato en las que predominan *P. multocida* subsp. *multocida* y *P. multocida* subsp. *septica*. Dado que *P. canis* es una especie relativamente nueva, es probable que antes fuera identificada como *P. multocida*<sup>11</sup>.

*P. dagmatis* y *P. stomatis* también fueron aisladas de infecciones posteriores a mordeduras de perros<sup>86</sup>.

Los animales colonizados son portadores asintomáticos pero, en determinadas circunstancias se infectan desarrollando septicemia y neumonía, además de brotes epidémicos, como es el caso del cólera aviario. El hombre se infecta por su contacto con animales, principalmente por mordedura o arañazo. El

perro y el gato son los animales que más conviven con el hombre y son ellos los que constituyen la mayor fuente de contacto.

Es importante destacar que *P. multocida* puede causar bacteriemia o meningitis seguida de la mordedura tanto en pacientes inmunocomprometidos como en inmunocompetentes. También pueden ocasionar bronquitis aguda en pacientes con obstrucción crónica de la vía aérea<sup>11</sup>. En estos pacientes cabe mencionar que pueden o no haber estado en contacto con animales domésticos.

Entre los factores más importantes que determinan su virulencia se pueden enumerar: la cápsula polisacáridica que inhibe la fagocitosis y la opsonización mediada por el complemento, los mecanismos para incorporación de hierro, el lipopolisacárido de membrana, que le confiere resistencia al suero, otros componentes de superficie que le facilitan la adherencia, enzimas extracelulares (hialuronidasa, neuraminidasa y proteasas) que facilitan la colonización y la diseminación y, en algunas cepas altamente virulentas, una toxina dermonecrotica (PMT) que causa rinitis atrófica y dermonecrosis y modula la respuesta inmune. Para mayores detalles se sugiere consultar la reciente revisión de Wilson y Ho<sup>86</sup>.

*Pasteurella pneumotropica* y *Pasteurella mairi* fueron aisladas de heridas infectadas por mordeduras de gatos. La primera de ellas, también en un paciente mordido por una rata<sup>29</sup>.

### ***Mannheimia haemolytica* y otras bacterias relacionadas**

*Mannheimia haemolytica* es la nueva denominación de la especie *P. haemolytica*, previamente descrita por Newsom y Cross en 1932 como causa de

neumonía, septicemia y aborto en animales domésticos, especialmente en ganado ovino y vacuno<sup>4, 61</sup>.

Raramente fue aislada a partir de seres humanos. Se informaron dos casos de endocarditis<sup>23,91</sup>, otro de una infección de injerto arterial<sup>73</sup>, un caso de crup bacteriano<sup>82</sup> y dos casos de septicemia: uno asociado a un absceso esplénico<sup>77</sup> y el otro, un caso fatal en un niño de 7 meses con neumonía y fiebre de tres semanas de evolución<sup>71</sup>.

*Bibersteinia trehalosi* es un patógeno del ganado ovino, vacuno y caprino, en ese orden de frecuencia. También se ha aislado de otras fuentes animales. Hasta el momento, en humanos, solo se registra un informe de dos infecciones posteriores a mordeduras de perro (una por *B. trehalosi* y la otra por una bacteria del mismo género pero de especie no identificada)<sup>29</sup>.

Otra bacteria de la familia *Pasteurellae*, *Frederiksenia canicola*, también fue aislada a partir de infecciones graves por mordeduras de perros<sup>29,43</sup>.

### ***Streptobacillus moniliformis***

El término “fiebre por mordedura de rata” define dos síndromes clínicos diferentes, ocasionados por los microorganismos *Streptobacillus moniliformis* y *Spirillum minus* como consecuencia de la mordedura de rata<sup>9</sup>. Esta fiebre se ha relacionado con las mordeduras de ratas silvestres, aunque algunos casos se asoció con ratas o roedores de laboratorio o empleados como mascotas.

Tras un período de incubación de 7-10 días después de la mordedura o ingestión de alimentos contaminados con excremento de rata, en el caso de la

infección por *Streptobacillus moniliformis*, se produce un inicio brusco de fiebre, escalofríos, cefaleas, mialgias y vómitos. Luego puede aparecer un eritema cutáneo, dolor articular grave y poliartritis migratoria y asimétrica o artritis séptica en alrededor del 50% de los pacientes. La enfermedad puede resolver en forma espontánea.

En un estudio sobre 62 casos de mordedura de rata asistidos en la ciudad de Buenos Aires entre 2002 y 2008 se registraron 5 cuadros clínicos compatibles con infección por *Streptobacillus* pero fallaron en no realizar hemocultivos ni cultivos de las lesiones<sup>74</sup>. Si bien los tratamientos empíricos pueden dar buenos resultados no debe olvidarse que las infecciones por mordedura pueden ser causadas por múltiples agentes presentes en la boca del animal, en la piel o mucosa de la víctima o en el ambiente<sup>70</sup>.

### **Experiencia argentina global**

En un estudio argentino, sobre un total de 101 aislamientos de bacilos gram negativos exigentes del período 1993-2004, 41 (40,6%) de los mismos fueron *E. corrodens*, 26 (25,7%) *Pasteurella* spp., 11 (10,9%) *Haemophilus (Aggregatibacter) aphrophilus*, 6 (5,9%) *Capnocytophaga* spp. (grupo DF1), 5 (5,0%) *A. actinomycetemcomitans* y *A. ureae*, 4 (4,0%) *K. kingae* y 8 (7,9 %) aislamientos de otros bacilos gram negativos también exigentes (ex grupo EF-4 del CDC, *Suttonella indologenes*, *Neisseria elongata* y *Dysgonomonas* spp.)<sup>3</sup>.

Entre los aislamientos de *E. corrodens* la mayoría (16-39%) correspondieron a abscesos de cabeza y cuello, seguido de heridas (10-24%), especímenes abdominales (5-12%), abscesos de pulmón o líquido pleural (4-10%) y sangre (3-

7%). De los 11 aislamientos de *A. aphrophilus* 6 correspondieron a abscesos de cabeza y cuello, 3 de sangre y 2 a otros especímenes<sup>3</sup>.

En este período todos los aislamientos de *C. hominis* y de *A. actinomycetemcomitans* fueron de sangre y correspondieron a pacientes con endocarditis infecciosa. Cinco de los 6 aislados de *Capnocytophaga* fueron bacteriemias primarias en pacientes neutropénicos y 2 de los 4 aislamientos de *Kingella* de sangre correspondieron a una bacteriemia primaria de un paciente hemodializado y a una bacteriemia con foco articular de un paciente pediátrico. De las tres bacteriemias por *A. aphrophilus* dos fueron casos de endocarditis y una fue una bacteriemia primaria y de los tres aislamientos de *E. corrodens* de sangre uno solo correspondió a un paciente con endocarditis y los otros dos fueron bacteriemias secundarias<sup>3</sup>.

## **Orientación diagnóstica**

No existen signos ni síntomas específicos de la infección producida por microorganismos del grupo HACEK y otros relacionados. No obstante algunos datos clínico-epidemiológicos pueden despertar la sospecha o bien ser una herramienta de gran utilidad para el laboratorio de microbiología, tanto para el aislamiento del microorganismo exigente como para la identificación del género y/o la especie.

En el contexto de la endocarditis bacteriana de curso subagudo se debe sospechar la posible etiología por HACEK cuando los hemocultivos continúan siendo negativos a las 24-48 h de incubación y el paciente no hubiera recibido tratamiento antibacteriano en el momento en que se extrajo la sangre.

Estas bacterias exigentes pueden estar involucradas en las infecciones por mordeduras. Si se trata de una mordedura humana, *E. corrodens* puede ser uno de los agentes causales, en tanto que, en las producidas por mascotas como perro y gato, *Pasteurella* es el agente más probable. *C. canimorsus* y *C. cynodegmi* pueden asociarse también con infecciones por mordedura o arañazo de perros.

Si se observan bacilos gram negativos fusiformes en botellas aerobias de hemocultivos de pacientes neutropénicos y con mucositis, debe sospecharse la presencia de especies de *Capnocytophaga* que habitan la cavidad oral humana. Obviamente, si fuera positiva una botella anaerobia con bacilos gram negativos fusiformes y el subcultivo resultara positivo en aerobiosis con atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub>, también deberían sospecharse las especies de este género, puesto que, *Fusobacterium* spp., con quién podría confundirse, es anaerobio estricto.

En las infecciones del sitio de inserción de agujas de pacientes drogadictos endovenosos también los microorganismos del grupo HACEK y relacionados, pueden hallarse entre los agentes etiológicos.

En pacientes menores de dos años con exantema petequial y bacteriemia además de *Neisseria meningitidis* el cuadro puede corresponder a *K. kingae*. *Kingella* puede ser el agente de osteoartritis en niños menores de dos años aun cuando el recuento de leucocitos del líquido articular no supere los 50.000 por mm<sup>3</sup>.

## **Aislamiento**

No hay un procedimiento específico para la detección de estos microorganismos en muestras clínicas, excepto que el aislamiento de *K. kingae* del

líquido articular de niños requiere de la inoculación del mismo en frascos de hemocultivos automatizados, puesto que con la metodología convencional en un gran número de casos no se ha podido recuperar este microorganismo<sup>89</sup>.

En Israel se pudo determinar que *K. kingae* causó 19 de 40 episodios documentados de artritis séptica (48%) en niños menores de 2 años al implementarse el cultivo en frasco de hemocultivo<sup>87</sup>. Además, si se utilizan métodos moleculares, el diagnóstico de *K. kingae* aumenta en forma significativa respecto de los métodos que implican cultivo<sup>15, 28, 37</sup>.

Por otra parte, el cultivo inicial en anaerobiosis de diversos materiales clínicos puede aumentar la recuperación de microorganismos de este grupo, tales como *E. corrodens*<sup>51</sup>.

En los hemocultivos, en general, el desarrollo es retrasado. Sin embargo, con el uso de hemocultivos automatizados quedó demostrado que las bacteriemias por HACEK se detectan dentro de los primeros 5 días de incubación. No obstante resulta prudente prolongar la incubación de los frascos por un período no inferior de tres semanas en los casos en que se sospeche bacteriemia por microorganismos exigentes (p. ej. endocarditis con hemocultivos negativos en las primeras 48 h).

Los cultivos en los que se observan bacterias gram negativas en el examen directo y no se obtiene crecimiento en las primeras 24-48 h de incubación en atmósfera hipercápnica en medios sólidos, deben incubarse por un período más largo de tiempo 4-5 días antes de descartarlos como cultivos sin desarrollo en aerobiosis. Además del agar Columbia o similar enriquecido con 5% de sangre es necesario también utilizar el agar chocolate por tratarse de un medio con un elevado contenido nutritivo para soportar el crecimiento de **las** bacterias exigentes.



## Identificación a nivel de género y especie

### ***Actinobacillus* y *Aggregatibacter***

*Actinobacillus* spp. son bacilos gram negativos no esporulados, o con forma cocoide con tendencia a la coloración bipolar. Se agrupan como células únicas, en pares y raramente en cadenas cortas. La misma morfología presentan las especies de *Aggregatibacter*, aunque los miembros de este género, ocasionalmente pueden presentar formas filamentosas.

*A. actinomycetemcomitans* crece lentamente en agar sangre y en agar chocolate; recién aparecen colonias visibles después de 48 a 72 h de incubación. Las colonias son pequeñas, lisas, no hemolíticas y tienen un borde ligeramente irregular. Las cepas frescas son adherentes al agar y difícilmente emulsificables. Con la incubación prolongada (5 a 7 días) las colonias pueden desarrollar una densidad central que semeja una estrella de 4 o 6 puntas. Al igual que en el caso de *A. aphropilus* el crecimiento en caldo es escaso y adherente a las paredes del tubo.

### ***Capnocytophaga***

Las bacterias del género *Capnocytophaga* son bacilos gram negativos pleomorfos, predominantemente fusiformes y con sus extremos aguzados.

En agar sangre las colonias crecen lentamente y son muy pequeñas a las 24 h de incubación a 37°C en atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub>. Recién alcanzan los 2 a 4

mm de diámetro después de 2 a 4 días de incubación. Las colonias son amarillas u ocreas con proyecciones marginales que aparecen como una película que rodea al área central de la colonia (movilidad deslizante) y adhieren a la superficie del agar.

Las especies de *Capnocytophaga* crecen en agar sangre y en agar chocolate y también pueden crecer en agar Thayer Martin modificado, debido a la resistencia que presentan a vancomicina, colistina y trimetoprima. *C. haemolytica* es la única especie  $\beta$ -hemolítica en sangre de carnero.

### ***Cardiobacterium***

*Cardiobacterium* spp. pueden presentarse en la coloración de Gram como bacilos gram variables con una tendencia de las células a retener el violeta de genciana en los polos. Las células individuales pueden aparecer ensanchadas en uno o ambos extremos, lo que conduce a microorganismos con forma de lágrima, pesa o chupetín. A menudo las células se agrupan formando rosetas. Es importante destacar que la morfología de las células individuales depende del tipo de medio de cultivo utilizado: a partir de agar chocolate esta morfología es menos distintiva que si la coloración es llevada a cabo a partir de agar sangre. Es posible que la tinción de Gram de los frascos de hemocultivos no ponga en evidencia a este microorganismo.

*C. hominis* puede crecer en todos los medios de cultivo disponibles en el mercado. El microorganismo no produce ningún cambio visible en el medio para hemocultivos (turbiedad, hemólisis, formación de película). En agar sangre y en agar chocolate crece bajo la forma de colonias opacas, brillantes y muy pequeñas,

después de 48 a 72 h de incubación a 35 °C en atmósfera con 5 a 7% de CO<sub>2</sub>. No desarrolla en medios entéricos.

### ***Suttonella***

En nuestra experiencia, *S. indologenes*, se presentó en la coloración de Gram como bacilos gruesos, cortos, de extremos redondeados, muy parecidos a *Moraxella* spp. Crece lentamente en agar sangre y este crecimiento es estimulado por CO<sub>2</sub>. Las colonias pueden crecer en forma diseminada o producir la corrosión del agar al igual que *E. corrodens*.

### ***Simonsiella***

Son bacilos gram negativos filamentosos que pueden retener parcialmente el violeta de genciana en la coloración de Gram.

*Simonsiella* crece aeróbicamente en agar sangre. Las colonias son de 1 – 2 mm de diámetro y pueden mostrar movilidad deslizante. *S. muelleri* es β-hemolítica.

### ***Dysgonomonas***

Los miembros del género *Dysgonomonas* en la coloración de Gram se observan como bacilos gram negativos pequeños o con formas cocoides.

*Dysgonomonas* spp. presentan colonias puntiformes a las 24 h de incubación. Después de las 48 a 72 h las colonias son blanco grisáceas, lisas y no hemolíticas y algunas cepas presentan un olor a frutilla.

### ***Eikenella***

*E. corrodens* se presenta como bacilos gram negativos finos, de bordes rectos y con extremos redondeados.

*E. corrodens* crece en agar sangre y en agar chocolate pero no en agar MacConkey. Las colonias son pequeñas: de 0,5 a 1 mm de diámetro luego de 48 horas de incubación. Alrededor del 50% de las cepas puede corroer el agar y pueden observarse tanto colonias con depresión como sin depresión en el mismo cultivo. Pueden presentar un pigmento amarillo pálido después de varios días de incubación y la mayoría de las cepas tienen olor semejante al hipoclorito de sodio.

### ***Kingella***

Los aislados de *Kingella* spp. son bacilos gram negativos cortos que a menudo se presentan en pares, grupos o cadenas y tienden a retener el violeta de genciana y colorearse en forma irregular. Crecen en agar sangre y en agar chocolate en una atmósfera enriquecida con 5 a 10 % de CO<sub>2</sub>, con colonias de 1 a 2 mm de diámetro después de 48 horas de incubación. Pueden presentarse como colonias lisas con una papila central o como colonias adherentes al agar con proyecciones marginales.

*K. kingae* es la única especie de este género que presenta una pequeña zona de  $\beta$ -hemólisis en agar sangre de carnero que la hace culturalmente similar a *Streptococcus agalactiae*. Las colonias tienen poca viabilidad con lo cual deben ser subcultivadas frecuentemente.

*K. denitrificans* puede ser confundida con *N. gonorrhoeae* debido a su capacidad de crecer en agar Thayer Martin, sobre todo en muestras orofaríngeas o genitourinarias<sup>34</sup>.

### ***Pasteurella***

*Pasteurella* spp. son cocobacilos o bacilos gram negativos muy pequeños que se disponen en forma aislada, en pares o en cadenas cortas. Es frecuente la tinción bipolar.

*Pasteurella* spp. desarrollan formando colonias medianas y convexas en medios nutritivos suplementados con sangre. Algunos aislamientos pueden presentar fenotipo mucoso. Cuando crecen en agar chocolate se parecen a las especies de *Haemophilus*, pero a diferencia de éstas, crecen muy bien en agar Columbia con sangre y no muestran el fenómeno de satelitismo frente a *Staphylococcus aureus*. Desprenden en los cultivos el mismo olor que *Haemophilus*, tal vez relacionado a la producción de indol a partir del triptofano.

### ***Streptobacillus***

*S. moniliformis* es un bacilo gram negativo con morfología variable. Según la edad y las condiciones del cultivo puede variar en su morfología. Tiende a formar

células filamentosas únicas, delgadas y largas. Estas células delgadas (aproximadamente de 1  $\mu\text{m}$  de ancho) pueden tener más de 100  $\mu\text{m}$  de longitud y plegarse en forma de asas y espirales. A menudo se tiñen irregularmente en la coloración de Gram. Con una incubación prolongada puede aparecer un ensanchamiento bulboso a lo largo del filamento, lo que le confiere al microorganismo un aspecto arrosariado. *S. moniliformis* es extremadamente exigente: requiere de 5 a 10% de  $\text{CO}_2$  y la adición de 20% de sangre, suero o líquido ascítico tanto a los medios sólidos como a los medios líquidos. Crece lentamente; las colonias se observan después de 72 h e incluso el desarrollo puede demorar hasta 7 días. Las colonias son pequeñas (1 a 2 mm de diámetro), convexas, blanco grisáceas, lisas y de consistencia butirosa. Algunas colonias presentan la apariencia de huevo frito. En medios líquidos pueden formar colonias como copos de algodón o migas de pan y se adhieren a las paredes del tubo. El microorganismo muere rápidamente a menos que se subcultive.

El crecimiento en frascos de hemocultivo puede ser inhibido por la presencia de polianetolsulfonato.

## **Pruebas bioquímicas y serológicas**

La identificación fenotípica de los bacilos gram negativos exigentes ofrece un sinfín de desafíos pues algunos de estos microorganismos no crecen en agar TSI (por ejemplo *E. corrodens*) y requieren de grandes inóculos y medios ricos en peptona para evaluar su actividad sacarolítica. El uso de medios no suplementados

para medir la acidez a partir de carbohidratos puede arrojar resultados falsamente negativos.

La formación de gas es escasa o está ausente en la mayoría de las especies. No obstante, *A. aphrophilus*, produce una cantidad de gas considerable durante la fermentación de la glucosa, que puede observarse en un tubo de caldo infusión cerebro corazón (BHI) con 1% de glucosa y tapón de vaselina-parafina.

La detección de la producción de indol puede requerir de la extracción con xileno y el revelado debe hacerse con el reactivo de Ehrlich en lugar de utilizar el reactivo de Kovacs.

La identificación correcta a nivel de especie requiere a menudo de una batería de pruebas no disponibles en los laboratorios de rutina.

Las características para la identificación de *A. actinomycetemcomitans* incluye la falta de crecimiento en agar MacConkey y en otros agares entéricos y reacciones positivas para la producción de catalasa y la reducción de nitratos. El microorganismo es oxidasa negativo (aunque cepas ocasionales pueden ser débilmente positivas), ureasa negativo, no produce indol y no requiere de factores V o X para crecer. No descarboxila aminoácidos. Las pruebas de catalasa (positiva), de ONPG (negativa) y la fermentación de lactosa (negativa) lo diferencian de *A. aphrophilus*.

Todas las especies de *Capnocytophaga* de origen humano son oxidasa y catalasa negativas, no descarboxilan la arginina y producen ácido a partir de glucosa, maltosa, sacarosa y manosa pero no a partir de ribosa, xilosa, manitol ni sorbitol. Las pruebas de oxidasa, catalasa y arginina dihidrolasa permiten su diferenciación de las especies de *Capnocytophaga* de origen animal.

*Cardiobacterium* spp. dan positivas las pruebas oxidasa y negativas las de catalasa, nitrato y ureasa. Las pruebas de oxidasa positiva y catalasa negativa las comparte con los géneros *Eikenella*, *Kingella* y *Sutonella*. La producción de indol es una característica que las diferencia de *Eikenella* y de *Kingella*. La fermentación del manitol y del sorbitol las diferencia de *S. indologenes*, otro microorganismo exigente productor de indol.

*Dysgonomonas* spp. son bacilos gram negativos oxidasa negativos y la reacción de catalasa varía de acuerdo a la especie: *D. capnocytophagoides* y *D. hofstadii* son catalasa negativos, *D. gadei* es catalasa positivo y *D. mossii* es catalasa variable. Todas las especies hidrolizan la esculina y son ureasa y nitratos negativos. Sin embargo, la característica más destacada del género es su dependencia solo del factor X (hemina), que comparte con la única especie de *Haemophilus* que infecta al hombre que muestra este fenómeno (*Haemophilus ducreyi*). La producción de indol es positiva en *D. mossii* y en *D. hofstadii* y variable en *D. gadei* y en *D. capnocytophagoides*. Todas las especies son ONPG positivas y fermentan la xilosa, la lactosa y la sacarosa.

Los aislamientos típicos de *E. corrodens* dan positivas las pruebas de oxidasa y catalasa, son asacarolíticos, reducen los nitratos, descarboxilan la ornitina y la descarboxilación de lisina es variable. Además, crecen pobremente o no crecen en agar TSI.

*Kingella* spp. son oxidasa positivas y catalasa negativas y con la excepción de *K. denitrificans*, no reducen los nitratos ni los nitritos. *K. kingae* fermenta glucosa y maltosa, *K. denitrificans* y *K. oralis* solo fermentan la glucosa, *K. potus* es asacarolítica y *S. indologenes* fermenta glucosa, maltosa y sacarosa. Las pruebas



de fosfatasa alcalina (positiva) y de fermentación del manitol y sorbitol (negativas) diferencian a *S. indologenes* de *C. hominis*.

*Pasteurella* no ofrece mayores dificultades en la identificación. Son bacterias inmóviles, oxidasa positivas y fermentadoras de la glucosa.

Se puede identificar como *Pasteurella multocida*, un cocobacilo gram negativo pequeño, con aroma acre o espermático, que produce acidez en el pico y en el fondo del agar, TSI sin producción de gas dentro de las 48 horas de incubación, no crece en agar EMB de Levine, es oxidasa positivo, inmóvil, no hidroliza la urea, descarboxila la ornitina y produce indol a partir de triptófano. Es de destacar que cepas inmóviles, nutricionalmente fastidiosas de *Enterobacteriaceae* (por ejemplo *Escherichia coli*) pueden ser identificadas incorrectamente como *Pasteurella* spp. a menos que se lleve a cabo la reacción de oxidasa.

La identificación de *S. moniliformis* se logra mediante la observación de la morfología filamentosa típica en la coloración de Gram y la realización de las pruebas de identificación bioquímica en medios suplementados con suero. La observación de acidez a partir de hidratos de carbono se realiza en caldos suplementados con el sustrato al 1 % y suero de caballo estéril al 0,5 %. El microorganismo es oxidasa y catalasa negativo, no reduce los nitratos, es indol y ureasa negativo pero hidroliza la esculina y da positiva la prueba de fosfatasa alcalina.

El algoritmo de identificación fenotípica se muestra en la Figura 1

## Métodos automatizados

Varios autores han demostrado el buen desempeño del sistema automatizado VITEK 2 para identificar microorganismos del grupo HACEK y relacionados a través de la tarjeta NH <sup>72, 76</sup>. Rennie et al. han señalado un 96,5% de identificación correcta (sobre un total de 371 aislamientos clínicos) en comparación con la secuenciación del gen *rRNA* 16S <sup>72</sup>. Los principales problemas de identificación se observan con las especies “no patógenas” de *Neisseria* <sup>72</sup>.

## Identificación por métodos de espectrometría de masa

La lenta velocidad de crecimiento y la baja reactividad del grupo HACEK y otros bacilos gram negativos exigentes en las pruebas bioquímicas contribuyen a que la identificación de estos microorganismos por la metodología convencional sea dificultosa. Por otra parte, el empleo de la biología molecular para arribar a la identificación definitiva no es accesible a la mayoría de los laboratorios y requiere de personal capacitado.

Almuzara et al. evaluaron la capacidad de la espectrometría de masas por tecnología MALDI-TOF (desorción-ionización de láser asistida por matriz-tiempo de vuelo) en la identificación de microorganismos del grupo HACEK y otros bacilos gram negativos exigentes utilizando dos técnicas de extracción y distintos puntos de corte (*scores*) de identificación<sup>1</sup>.

Se estudió una colección de 155 microorganismos del grupo HACEK y otros bacilos gram negativos exigentes (*Actinobacillus*, *Capnocytophaga*, *Dysgonomonas*,

*Leptotrichia*, *Mannheimia*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Pasteurella* y *Sutonella*) aislados de muestras clínicas (período 2010-2015) de pacientes atendidos en un Hospital Universitario de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Todos los aislados fueron previamente identificados por pruebas bioquímicas convencionales. La identificación por espectrometría de masas se llevó a cabo con un equipo Bruker Daltonics, Biotyper 3.1 (Alemania).

El porcentaje de ID correcta fue: 93,55/69,03 a nivel de género y especie respectivamente utilizando los puntos de corte del fabricante y 98,06/92,90 usando los puntos de corte más bajos.

La identificación precisa de 14 géneros mostró la confiabilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF como una metodología alternativa a los métodos de identificación que se utilizan actualmente de rutina en los laboratorios para identificar el grupo HACEK y otros bacilos gram negativos exigentes. La disminución de los puntos de corte para asignar género y especie permite mejorar el rendimiento de esta metodología<sup>1</sup>.

## **Métodos moleculares**

Con relación a *A. actinomycetemcomitans*, algunos estudios genéticos han demostrado que el gen que codifica para el ARNr 23S se divide en esta especie en dos formas más pequeñas mientras que la transcripción es continua en *A. aphrophilus*, *Aggregatibacter segnis* y *H. influenzae*. El reconocimiento de este patrón atípico de ARN en la electroforesis en gel de poliacrilamida puede brindar una herramienta para la identificación de esta especie. Sobre la base de los

polisacáridos de superficie, pueden distinguirse 5 serotipos de *A. actinomycetemcomitans*, de los cuales los serotipos a, b, y c son los más frecuentes. El serotipo b está asociado con periodontitis, endocarditis y resistencia a penicilina y el c está asociado con la enfermedad periodontal e infecciones extraorales<sup>65</sup>.

La identificación fenotípica de las especies de *Capnocytophaga* es dificultosa ya sea a través de métodos convencionales o automatizados. La secuenciación del gen *16S rRNA* es al presente el mejor método para arribar a la especie<sup>17</sup>.

Como sucede con otros microorganismos implicados en la infección periodontal se han diseñado sondas de ADN específicas para *E. corrodens* que han sido utilizadas para la detección directa del microorganismo en muestras de la placa subgingival de pacientes con gingivitis y periodontitis<sup>50</sup>.

En vista de la cercanía fenotípica de algunas taxas, la identificación de las especies de *Pasteurella* por sistemas automatizados en muchos casos no es satisfactoria. En este sentido, la secuenciación de los genes *16S rRNA* y en especial del gen *sodA* proveen una identificación confiable a nivel de especie<sup>27</sup>.

Se han desarrollado técnicas de reacción de la polimerasa en cadena (PCR) basadas en la amplificación y posterior secuenciación del gen codificante del ARNr 16S para abordar la identificación correcta de *S. moniliformis* pues su inercia bioquímica hace dificultosa su identificación<sup>9</sup>.

## **Sensibilidad a los antibióticos**

*Aggregatibacter* spp. son sensibles a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y a las fluoroquinolonas. La resistencia a penicilinas y aminopenicilinas

es más frecuente en *A. actinomycetemcomitans*. A menudo esta resistencia no es debida a la producción de  $\beta$ -lactamasas, sin embargo unos pocos aislados son capaces de producirlas <sup>65</sup>.

*E. corrodens* es sensible a penicilina, cefalosporinas de tercera y cuarta generación y fluoroquinolonas. Los aminoglucósidos, las cefalosporinas de primera generación y los macrólidos muestran pobre actividad frente a esta especie. Todos los aislados son resistentes a las lincosamidas. Puede haber aislados resistentes a penicilina y aminopenicilinas por producción de  $\beta$ -lactamasa. Estas cepas son sensibles a la combinación de aminopenicilinas con inhibidores <sup>78</sup>.

*Cardiobacterium* es habitualmente sensible a la penicilina. Las fluoroquinolonas también son muy activas sobre las bacterias de este género. Excepcionalmente, se han informado cepas productoras de  $\beta$ -lactamasa, una de ellas con CIM elevada de cefotaxima (4  $\mu$ g/ml)<sup>58</sup>. Al igual que *Eikenella*, presenta resistencia natural a clindamicina.

*Kingella* es sensible a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, incluida la penicilina, y también es resistente a clindamicina. En muy pocas oportunidades se han descrito aislados que producen  $\beta$ -lactamasas<sup>87</sup>.

*Pasteurella* spp. y *Actinobacillus* spp. son sensibles a penicilina, aminopenicilinas, carbapenems y cefalosporinas de tercera y cuarta generación. Las cefalosporinas de primera generación son menos activas y no se recomiendan en el tratamiento de las infecciones ocasionadas por ellos. Tampoco son activos los macrólidos. Las fluoroquinolonas muestran excelente actividad sobre estos géneros <sup>18</sup>.

Más de la mitad de los aislados de *Capnocytophaga* spp., de origen humano son productores de una cefuroximasa (cfxA) capaz de hidrolizar a la penicilina, a las

aminopenicilinas y a las cefalosporinas de tercera generación. Esta enzima es inhibida por inhibidores, por lo que piperacilina-tazobactama, amoxicilina-ácido clavulánico y ampicilina-sulbactama muestran buena actividad sobre *Capnocytophaga* spp. Todos los aislados han sido sensibles a los carbapenems. Los aminoglucósidos y los polipéptidos no son activos en tanto que las fluoroquinolonas muestran muy buena actividad sobre la mayoría de las especies<sup>40, 81</sup>.

Cabe destacar que *Leptotrichia* spp., a diferencia de *Capnocytophaga*, presenta resistencia a las fluoroquinolonas y no a los antibióticos polipeptídicos.

Las endocarditis de las válvulas nativas producidas por microorganismos del grupo HACEK se deben tratar con antibacterianos durante 4 semanas, mientras que en las que se afectan las válvulas protésicas el tratamiento se prolonga a 6 semanas. El grado de curación para la endocarditis por HACEK asociada a prótesis valvular es alto y a diferencia de la endocarditis por otros bacilos gram negativos, casi siempre responde a los antimicrobianos, sin necesidad del reemplazo valvular. Siguiendo las recomendaciones del Consenso Argentino de Endocarditis, el tratamiento debe hacerse con ceftriaxona 2 g EV, en una dosis diaria durante 4 o 6 semanas. En pacientes alérgicos a  $\beta$ -lactámicos puede considerarse el uso de fluoroquinolonas asociadas a un aminoglucósido<sup>24</sup>.

Las infecciones osteoarticulares por *Kingella* se deben tratar con ampicilina, ceftriaxona o cefuroxima una vez conocido el resultado de la sensibilidad del microorganismo. El tratamiento ha variado de 17 días a 3 meses para la artritis, de 3 semanas a 6 meses para la osteomielitis y de 3 a 12 meses para la espondilodiscitis. El drenaje quirúrgico es necesario en artritis de hombro y cadera. En pacientes con osteomielitis, formación de abscesos, bacteriemia persistente y secuestros óseos, debe considerarse además, el tratamiento quirúrgico. En pacientes con

espondilodiscitis o absceso paraespinal con signos neurológicos se recomienda el drenaje quirúrgico<sup>87</sup>.

Con referencia a las pruebas de sensibilidad, el CLSI desde 2006 ha publicado una guía con las recomendaciones a seguir para realizar, informar e interpretar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos de microorganismos exigentes. Solo se recomienda el método de difusión para *Pasteurella* spp. Para el resto de estos microorganismos se sugiere el de dilución<sup>19</sup>.

Dada la practicidad, el método epsilométrico es utilizado por muchos laboratorios para determinar la sensibilidad a los antibacterianos en estos microorganismos. No hay una recomendación uniforme al respecto, pero en general se puede ensayar utilizando agar Mueller Hinton con sangre ovina o agar chocolate de acuerdo a las exigencias del microorganismo. Siempre se recomienda una incubación de 24-48 h en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

También se recomienda realizar la prueba de  $\beta$ -lactamasa por el método cromogénico en estos microorganismos, aunque la posibilidad de encontrar cepas productoras de esta enzima es poco frecuente. Un resultado positivo, invalida el uso de penicilina o aminopenicilinas para el tratamiento.

## Algoritmo de identificación dicotómica de microorganismos del grupo HACEK y géneros relacionados

### Bacilos y cocobacilos gram negativos, no fermentadores, oxidasa positivos, exigentes nutricionales

- 1a. Urea - 2
- 1b. Urea + 10
- 2 a. SH<sub>2</sub> (TSI) + *Francisella philomiragia*
- 2 b. SH<sub>2</sub> (TSI) - 3
- 3 a. Catalasa + 4
- 3 b. Catalasa - 6
- 4 a. NO<sub>3</sub> + *Neisseria zoodegmatis* (olor a pochoclo)
- 4 b. NO<sub>3</sub> - 5
- 5 a. Acetato + *Neisseria elongata* subsp. *glycolitica*
- 5 b. Acetato - *Neisseria weaveri*
- 6 a. ODC + *Eikenella corrodens*
- 6 b. ODC - 7
- 7 a. NO<sub>3</sub> + *Neisseria elongata* subsp. *nitroreducens*
- 7 b. NO<sub>3</sub> - 8
- 8 a. Gas NO<sub>2</sub> + *Neisseria elongata* subsp. *elongata*
- 8 b. Gas NO<sub>2</sub> - 9
- 9 a. FAL +; DNasa - *Kingella oralis*
- 9 b. FAL -; DNasa + *Kingella potus*
- 10 a. Catalasa - *Afipia felis*
- 10 b. Catalasa + 11
- 11 a. Gram cb; xilosa + *Brucella* spp.
- 11 b. Gram dc-; xilosa - *Psychrobacter phenylpiruvicus*

---

cb = cocobacilos; dc = diplococos

### Bacilos y cocobacilos gram negativos, no fermentadores, oxidasa negativos, exigentes nutricionales

- 1 a. Urea + 2
- 1 b. Urea - 3
- 2 a. NO<sub>3</sub> + *Brucella canis*
- 2 b. NO<sub>3</sub> - *Bordetella parapertussis*
- 3 a. Movilidad + 4
- 3 b. Movilidad - 5
- 4 a. Esculina + *Massilia timonae*
- 4 b. Esculina - *Bordetella trematum*



- 5 a.  $\text{NO}_3 + \text{NO}$
- 5 b.  $\text{NO}_3 - 6$
- 6 a. Pigmento marrón difusible *Bordetella holmesii*
- 6 b. Pigmento marrón difusible – 7
- 7 a. Colonias diferentes con forma de coliflor *Bartonella* spp.
- 7 b. Colonias no diferentes, no forma de coliflor *Francisella/Streptobacillus moniliformis*

**Bacilos o cocobacilos gram negativos, fermentadores, oxidasa negativos, exigentes nutricionales**

1) Dependencia de Factor V y X : +/-

- 1 a. Hemólisis  $\beta$  positiva *H. parahaemolyticus*
- 1 b. Hemólisis  $\beta$  negativa 2
- 2 a. Lactosa + *A. aphrophilus* dependiente de NAD
- 2 b. Lactosa negativa 3
- 3 a. Manosa + *H. parainfluenzae*
- 3 b. Manosa – *A. segnis*

2) Dependencia de Factor V/X +/-

- 1 a. Hemólisis  $\beta +$  *H. haemolyticus*
- 1 b. Hemólisis  $\beta -$  *H. influenzae*

3) Dependencia de Factor V/X -/+

- 1 a. Esculina - Indol – *A. aphrophilus*
- 1 b. Esculina + Indol + 2
- 2 a. Catalasa + *Dysgonomonas gadei*
- 2 b. Catalasa – *Dysgonomonas capnocytophagoides*

4) Dependencia de Factor V/X -/-

- 1 a. Catalasa – 2
- 1 b. Catalasa + 4
- 2 a. Bacilos pleomórficos, filamentos o bacilos fusiformes + 3
- 2 b. Bacilos no pleomórficos, no filamentos ni bacilos fusiformes – 5
- 3 a. ADH – *Capnocytophaga* spp.
- 3 b. ADH + *Streptobacillus moniliformis*
- 4 a.  $\text{NO}_3 -$  *Dysgonomonas gadei*
- 4 b.  $\text{NO}_3 +$  *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

- 5 a. NO<sub>3</sub> + 6
- 5 b. NO<sub>3</sub> – 7
- 6 a. Lactosa/Indol -/ + *Pasteurella bettyae*
- 6 b. Lactosa/Indol +/- - *A. aphrophilus*
- 7 a. Xilosa - DF3-like
- 7 b. Xilosa + *Dysgonomonas capnocytophagoides*

**Bacilos o cocobacilos gram negativos, fermentadores, oxidasa positivos, exigentes nutricionales**

1) Dependencia de Factor V y X : +/-

- 1 a. Hemólisis β positiva *H. parahaemolyticus*
- 1 b. Hemólisis β negativa 2
- 2 a. Lactosa + *A. aphrophilus* dependiente de NAD
- 2 b. Lactosa negativa 3
- 3 a. Manosa + *Haemophilus parainfluenzae*
- 3 b. Manosa – *A. segnis*

2) Dependencia de Factor V/X +/-

- 1 a. Hemolisis beta + *H. haemolyticus*
- 1 b. Hemolisis beta – *H. influenzae*

3) Dependencia de Factor V/X -/+

- 1 a. Indol/catalasa +/- *Haemophilus haemoglobinophilus*
- 1 b. Indol/catalasa -/- *A. aphrophilus*

4) Dependencia de Factor V/X -/-

- 1 a. Catalasa – 2
- 1 b. Catalasa + 9
- 2 a. Indol + 3
- 2 b. Indol – 4
- 3 a. Gas glucosa + *Pasteurella bettyae*
- 3 b. Gas glucosa – 14
- 4 a. Urea + *Actinobacillus* spp.
- 4 b. Urea - 5
- 5 a. FAL – 6
- 5 b. FAL + 8
- 6 a. Maltosa + *Simonsiella* spp.
- 6 b. Maltosa – 7
- 7 a. Gas NO<sub>2</sub> + *Kingella denitrificans*
- 7 b. Gas NO<sub>2</sub> – *Neisseria elongata* subsp. *nitroreducens*

- 8 a. Maltosa + *Kingella kingae*
- 8 b. Maltosa – *Kingella oralis*
- 9 a. ADH + 10
- 9 b. ADH – 11
- 10 a. Bacilos fusiformes + *Capnocytophaga* spp.
- 10 b. Bacilos fusiformes – *Neisseria animaloris*
- 11 a. NO<sub>3</sub> + 12
- 11 b. NO<sub>3</sub> – 13
- 12 a. Sacarosa + 16
- 12 b. Sacarosa – *A. actinomycetemcomitans*
- 13 a. FAL/Indol +/+ *Suttonella indologenes*
- 13 b. FAL/Indol -/- *Neisseria elongata* subsp. *glycolytica*
- 14 a. FAL + *Suttonella indologenes*
- 14 b. FAL - 15
- 15 a. Manitol/maltosa/sacarosa +/+/*Cardiobacterium hominis*
- 15 b. Manitol/maltosa/sacarosa -/-/- *Cardiobacterium valvarum*
- 16 a. Urea/manitol +/+ 17
- 16 b. Urea/manitol -/-, +/- , -/+ 21
- 17 a. Esculina + *Actinobacillus suis*
- 17 b. Esculina – 18
- 18 a. Xilosa/ONPG -/- *Actinobacillus ureae*
- 18 b. Xilosa/ONPG +/+ 19
- 19 a. Melibiosa/trehalosa -/- *Actinobacillus lignieresii*
- 19 b. Melibiosa/trehalosa +/+ 20
- 20 a. Manosa + *Actinobacillus equuli*
- 20 b Manosa – *Actinobacillus hominis*
- 21 a. Urea + 22
- 21 b. Urea – 24
- 22 a. Indol – *Pasteurella aerogenes*
- 22 b. Indol + 23
- 23 a. ODC + *Pasteurella pneumotropica*
- 23 b. ODC – *Pasteurella dagmatis*
- 24 a Indol – *Avibacterium (Pasteurella) gallinarum*
- 24 b Indol + 25
- 25 a. ODC + 26
- 25 b. ODC - *Pasteurella stomatis*
- 26 a. Manitol + *Pasteurella multocida*
- 26 b. Manitol – *Pasteurella canis*

## Bibliografía

1. Almuzara M, Barberis C, Vargas Cárdenas K, Ramírez MS, Famiglietti A, Vay C. Evaluación de la espectrometría de masas (MALDI-TOF) en la identificación de microorganismos del grupo HACEK y otros bacilos gram negativos fastidiosos. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología ALAM-CAM 2016, IV Congreso Latinoamericano de Microbiología de Medicamentos y Cosméticos – CLAMME y la Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y Otras Micobacteriosis (SLAMTB). 2016, Resumen. MA0068, Rosario, Argentina.
2. Almuzara MN, Cittadini R, Ladelfa PJ, Olivieri L, Ramírez MS, Zamponi C, Famiglietti AM, Vay CA. Bacteremia caused by *Dysgonomonas* spp.: a report of two cases. Clin Microbiol Newsl. 2009; 31:99-102.
3. Almuzara M, Mattera J, Perazzi B, Barberis C, de Mier C, García S, Rodríguez CH, Granados G, Losada M, Famiglietti A, Vay C. Bacilos gram negativos fastidiosos y misceláneos: una experiencia en un hospital universitario. Congreso Latinoamericano de Microbiología. 2004. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
4. Angen O, Muters R, Caugant DA, Olsen JE, Bisgaard M. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. And *Mannheimia varigena* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1999; 49:67-8.
5. Barberis C, Almuzara M, Tytium A, Famiglietti A, Vay C. Corneal abscess due to *Suttonella indologenes*. Clin Microbiol Newsl. 2007; 29: 139-42.
6. Bhan I, Chen EJ, Bazari H. Isolation of *Cardiobacterium hominis* from the peritoneal fluid of a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. Scand J Infect Dis. 2006; 38:301-3.
7. Blackall PJ, Bojesen AM, Christensen H, Bisgaard M. Reclassification of [*Pasteurella*] *trehalosi* as *Bibersteinia trehalosi* gen. nov., comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2007;57(Pt 4):666-74.
8. Bonatti H, Rossboth DW, Nachbaur D, Fille M, Aspöck C, Hend I, Hourmont K, White L, Malnick H, Allerberger FJ. A series of infections due to *Capnocytophaga* spp. in immunosuppressed and immunocompetent patients. Clin Microbiol Infect. 2003;9:380-7.

9. Boot R, Oosterhuis A, Thuis HC. PCR for the detection of *Streptobacillus moniliformis*. Lab Anim. 2002;36:200-8.
10. Bothelo E, Gouriet F, Fournier P, Roux V, Habib G, Thuny F, Metras D, Raoult D, Casalta J. Infective endocarditis caused by *Cardiobacterium valvarum*. J Clin Microbiol. 2006; 44: 657-8.
11. Bottone EJ, Hanna B, Hong T, Inzana TJ, Namdari H, Qureshi MN, Weyant RS. Cumitech 27, Laboratory diagnosis of zoonotic infections: bacterial infections obtained from companion and laboratory animals. Coordinating ed. Inzana TJ. American Society for Microbiology, Washington D.C, 1996.
12. Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. Clin Microbiol Rev. 2001; 14:177-207.
13. Cardoso JN, Ochiai ME, Oliveira MT Jr, Morgado P, Munhoz R, Andretto FE, Mansur AJ, Barretto AC. *Eikenella corrodens* infective endocarditis. Arq Bras Cardiol. 2005; 85:63-4.
14. Chambers ST, Murdoch D, Morris A, Holland D, Pappas P, Almela M, Fernández-Hidalgo N, Almirante B, Bouza E, Forno D, del Rio A, Hannan MM, Harkness J, Kanafani ZA, Lalani T, Lang S, Raymond N, Read K, Vinogradova T, Woods CW, Wray D, Corey GR, Chu VH, International Collaboration on Endocarditis Prospective Cohort Study Investigators. HACEK infective endocarditis: characteristics and outcomes from a large, multi-national cohort. PloS One. 2003;8:e63181. doi:10.1371/ journal.pone.0063181.
15. Chometon S, Benito Y, Chaker M, Boisset S, Ploton C, Bérard J, Vandenesch F, Freydiere AM. Specific real-time polymerase chain reaction places *Kingella kingae* as the most common cause of osteoarticular in young children. Pediatr Infect Dis J. 2007; 26:377-81.
16. Christou L, Economou G, Zikou AK, Saplaoura K, Argyropoulou MI, Tsianos EV. Acute *Haemophilus parainfluenzae* endocarditis: a case report. J Med Case Rep. 2009; 3:7494.
17. Ciantar M, Newman HN, Wilson M, Spratt DA. Molecular identification of *Capnocytophaga* spp. via 16S rRNA PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol. 2005 43:1894-901.
18. Citron MD, Warren YA, Fernandez HT, Goldstein MA, Tyrell KL, Goldstein EJ. Broth microdilution and disk diffusion tests for susceptibility testing of *Pasteurella* species isolated from human clinical specimens. J Clin Microbiol. 2005; 43:2485–8.

19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. Approved guideline, 2010; M45-A2. Wayne, PA, EE.UU.
20. Currie P, Codispoti M, Mankadt P, Godman M. Late aortic homograft valve endocarditis caused by *Cardiobacterium hominis*: a case report and review of the literature. *Heart*. 2000; 83: 579-81.
21. de Castro N, Pavie J, Lagrange-Xélot M, Bouvry D, Delisle F, Parrot A, Molina JM. Severe *Actinobacillus ureae* meningitis in an immunocompromised patient: report of one case and review of the literature. *Scand J Infect Dis*. 2007;39:1076-9.
22. Dewhirst FE, Paster BJ, La Fontaine S, Rood JI. Transfer of *Kingella indologenes* (Snell and Lapage 1976) to the genus *Suttonella* gen. nov. as *Suttonella indologenes* comb. nov.; transfer of *Bacteroides nodosus* (Beveridge 1941) to the genus *Dichelobacter* gen. nov. as *Dichelobacter nodosus* comb. nov.; and assignment of the genera *Cardiobacterium*, *Dichelobacter*, and *Suttonella* to *Cardiobacteriaceae* fam. nov. in the gamma division of *Proteobacteria* on the basis of 16S rRNA sequence comparisons. *Int J Syst Bacteriol*. 1990; 40:426-33.
23. Doety G, Loomus G, Wolf P. *Pasteurella* endocarditis. *N Engl J Med*. 1963; 268: 830.
24. Ferreiros N, Nacinovich F, Casabe J, Modenesi J, Swieszkowski S, Cortes C, Hernan C, Kazelian L, Varini S; EIRA-2 Investigators. Epidemiologic, clinical and microbiologic profile of infective endocarditis in Argentina: a national survey. The "Endocarditis Infecciosa en la República Argentina-2" (EIRA-2) study. *Am Heart J*. 2006; 151:545-52.
25. Frandsen EV, Poulsen K, Könönen E, Kilian M. Diversity of *Capnocytophaga* species in children and description of *Capnocytophaga leadbetteri* sp. nov. and *Capnocytophaga* genospecies AHN8471. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008 ;58:324-36.
26. Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. Taxonomic outline of the Archaea and Bacteria. En: Garrity GM, editor. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>th</sup> edition. New York, Springer, 2005, p. 207-20.
27. Gautier AL, Dubois D, Escande F, Avril JL, Trieu-Cuot P, Gaillot O. Rapid and accurate identification of human isolates of *Pasteurella* and related species by sequencing the *sodA* gene. *J Clin Microbiol*. 2005; 43:2307-14.
28. Gómez Bonduel V, Chayep D, Venuta ME, Hernández C, Casimir L, Pinheiro JL, Mastroianni A, Lopardo H. Utilización de un método molecular para la detección de *Kingella kingae* en muestras osteoarticulares. *Medicina Infantil* 2013; 20: 13-6.

29. Gustavsson O, Johansson AV, Monstein HJ, Nilsson LE, Bredberg A. A wide spectrum of fastidious and ampicillin-susceptible bacteria dominate in animal-caused wounds. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35:1315-21.
30. Han XY, Falsen E. Characterization of oral strains of *Cardiobacterium valvarum* and emended description of the organism. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2370-4.
31. Heiro M, Nikoskelainen J, Engblom E, Kotilainen P. *Eikenella corrodens* prosthetic valve endocarditis in a patient with ulcerative colitis. *Scand J Infect Dis.* 2000;32:324-5.
32. Higurashi Y, Tatsuno K, Fujimoto F, Kobayashi I, Ida K, Seto Y, Ohkusu K, Ezaki T, Okugawa S, Moriya K. Two cases of bacteremia caused by *Leptotrichia trevisanii* in patients with febrile neutropenia. *J Infect Chemother.* 2013;19:1181-4.
33. Hofstad T, Olsen I, Eribe ER, Falsen E, Collins MD, Lawson PA. *Dysgonomonas* gen. nov. to accommodate *Dysgonomonas gadei* sp. nov., an organism isolated from a human gall bladder, and *Dysgonomonas capnocytophagoides* (formerly CDC group DF-3). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000;50: 2189-95.
34. Hollis DG, Wiggins GL, Weaver RE. An unclassified gram-negative rod isolated from the pharynx on Thayer-Martin medium (selective agar). *Appl Microbiol.* 1972;24:772-7.
35. Hombach M, Frey H, Pfyffer G. Urinary tract infection caused by *Eikenella corrodens*. *J Clin Microbiol.* 2007;45:675.
36. Huang S, Lee H, Lee N, Liu K, Ko W. Clinical characteristic of invasive *Haemophilus aphrophilus* infections. *J Microbiol Immunol Infect.* 2005;38:271-6.
37. Ilharreborde B, Bidet P, Lorrot M, Even J, Mariani-Kurkdjian P, Liguori S, Vitoux C, Lefevre Y, Doit C, Fitoussi F, Penneçot G, Bingen E, Mazda K, Bonacorsi S. New real-time PCR-based method for *Kingella kingae* DNA detection: application to samples collected from 89 children with acute arthritis. *J Clin Microbiol.* 2009;47:1837-41.
38. Iorcansky S, Lopardo H, Bologna R, Rubeglio E. Tiroiditis aguda supurada en niños; Identificación de *Eikenella corrodens* como agente patógeno. XI Congreso Latinoamericano de Microbiología y IV Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires, abril de 1991.
39. Janda JM, Graves MH, Lindquist D, Probert WS. Diagnosing *Capnocytophaga canimorsus* infections. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 340-2.

40. Jolivet-Gougeon A, Sixou JL, Tamanai-Shacoori Z, Bonnaure-Mallet M. Antimicrobial treatment of *Capnocytophaga* infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2007; 29:367–73.
41. Kehl-Fie T, St. Geme J. Identification and characterization of an RTX toxin in the emerging pathogen *Kingella kingae*. *J Bacteriol*. 2007;189:430-6.
42. Kennedy C, Rosen H. *Kingella kingae* bacteremia and adult epiglottitis in a granulocytopenic host. *Am J Med*. 1988;85:701-2.
43. Korczak BM, Bisgaard M, Christensen H, Kuhnert P. *Frederiksenia canicola* gen. nov., sp. nov. isolated from dogs and human dog-bite wounds. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2014;105:731-41.
44. Kugler K, Biedenbach D, Jones R. Determination of antimicrobial activity of 29 clinically important compounds tested against fastidious HACEK group organism. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1999;34:73-6.
45. Kuzucu C, Yetkin G, Kocak G, Nisanoglu V. An unusual case of pericarditis caused by *Cardiobacterium hominis*. *J Infect*. 2005; 50:346-7.
46. Lavy CBD. Septic arthritis in Western and sub-Saharan African children – a review. *Int Orthop*. 2007;31:137-44.
47. Lawson PA, Carlson P, Wernersson S, Moore ER, Falsen E. *Dysgonomonas hofstadii* sp. nov., isolated from a human clinical source. *Anaerobe*. 2010;16:161-4.
48. Lawson PA, Falsen E, Inganäs E, Weyant RS, Collins MD. *Dysgonomonas mossii* sp. nov., from human sources. *Syst Appl Microbiol*. 2002; 25:194-7.
49. Liang JJ, Swiecicki PL, Killu AM, Sohail MR. *Haemophilus parainfluenzae* prosthetic valve endocarditis complicated by septic emboli to brain. *BMJ Case Rep*. 2013 Jun 3. pii: bcr2013009744. doi: 10.1136/bcr-2013-009744.
50. Lippke JA, Peros WJ, Keville MW, Savitt ED, French CK. DNA probe detection of *Eikenella corrodens*, *Wolinella recta* and *Fusobacterium nucleatum* in subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*. 1991;6:81-7.
51. Litterio M, Hernández C, Lopardo H. Cuatro casos de infecciones por *Eikenella corrodens* y su diagnóstico a partir de la siembra en condiciones anaerobias. XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología y X Congreso Argentino de Microbiología. Resumen A-187. Buenos Aires, 17 al 21 de octubre de 2004.



52. Lopardo H, Callejo R, Leardini N, Hernández C, Ruboglio E. *Eikenella corrodens* Infecciones en tres pacientes pediátricos. 2do. Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología (SADI). 1er Congreso de Infectología Pediátrica de la Sociedad Argentina de Pediatría (SAP). 1er Simposio de Control de Infecciones. Buenos Aires abril de 1992.
53. Lorenzo Garde L, Bolaños Rivero M, Turégano García Á, Martín Sánchez AM. Intraperitoneal abscess for *Eikenella corrodens*. Rev Esp Quimioter. 2011; 24:115-6.
54. Lundy DW, Kehl DK. Increasing prevalence of *Kingella kingae* in osteoarticular infections in young children. J Pediatr Orthop. 1998; 18:262-7
55. Mahapatra A, Mishra S, Pattnaik D, Patnaik K. Bacterial endocarditis due to *Eikenella corrodens*: a case report. Indian J Med Microbiol. 2003; 21:135-6.
56. Maraki S, Papadakis IS, Chronakis E, Panagopoulos D, Vakis A. *Aggregatibacter aphrophilus* brain abscess secondary to primary tooth extraction: Case report and literature review. J Microbiol Immunol Infect. 2016;49:119-2.
57. Martínez-Sánchez L, Vasallo FJ, García-Garrote F, Alcalá L, Rodríguez-Créixems M, Bouza E. Clinical isolation of a DF-3 microorganism and review of the literature. Clin Microbiol Infect. 1998;4:344-6.
58. Maurissen W, Eyskens B, Gewillig M, Verhaegen J. Beta-lactamase positive *Cardiobacterium hominis* strain causing endocarditis in a pediatric patient with tetralogy of Fallot. Clin Microbiol Newsl. 2008;30:132-3.
59. Morante AP, Sanjuanbenito A, Mendía E, Giordano PG, Angarita FG. Liver abscess by *Eikenella corrodens*. Rev Esp Enferm Dig. 2015;107:574-5.
60. Nacinovich F, Montes J, Bermejo J, Bonvehi P, Bugarín G, Caiaffa D, Calan L, Calmaggi A, Carbone E, Casey M, Chocconi E, Godemberg F, Lopardo G, Marín M, Mera J, Morales A, Pagannini H, Paulin J, San Román E, Sijo A, Soloaga R, Trivi M, Vázquez L, Wallach J, Balza Moreno J, Bena J, Casseti I, Ezcurra C, Herrera F, Hevia J, Lorenzo L, Martínez Aquino E, Pellegrini C, Sampó E, Sokn F, Temporitti E, Vidal G. Tratamiento médico de la endocarditis infecciosa. Rev Argent Cardiol. 2002; 70:21-46.
61. Newsom I, Cross F. Some bipolar organism found in pneumonia in sheep. J Am Vet Med Assoc. 1932;80:711-9.

62. Nørskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56:2135-44.
63. Nwaohiri N, Urban C, Gluck J, Ahluwalia M, Wehbeh W. Tricuspid valve endocarditis caused by *Haemophilus parainfluenzae*: a case report and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;64:216-9.
64. Olsen I, Dewhirst FE, Paster BJ, Busse HJ. Family I. *Pasteurellaceae*. En: Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editors, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, New York, Springer-Verlag, 2005, p. 851-912.
65. Paju S, Carlson P, Jousimies-Somer H, Asikainen S. Heterogeneity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in various human infections and relationships between serotype, genotype, and antimicrobial susceptibility. *J Clin Microbiol.* 2000;38:79-84.
66. Paturel L, Casalta J, Habib G, Nezri M, Raoult D. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* endocarditis. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10:98-118.
67. Paul K, Patel P. *Eikenella corrodens* infections in children and adolescents: cases reports and review of the literature. *Clin Infect Dis.* 2001;33:54-61.
68. Petti C, Bhally H, Weinstein M, Joho K, Wakefield T, Reller L, Carroll K. Utility of extended blood culture incubation for isolation of *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, and *Kingella* organism: a retrospective multicenter evaluation. *J Clin Microbiol.* 2006;44:257-9.
69. Potron A, Mainardi JL, Podglajen I, Meunier F, Sanson-le Pors MJ, Berçot B. Recurrent infective endocarditis due to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: reinfection or relapse?. *J Med Microbiol.* 2010;59:1524-6.
70. Puccar PS, Santos P, Lopardo H, Berberian G, Fernández C. Infección por mordedura de rata. *Medicina Infantil.* 2011;18:267-71.
71. Punpanich W, Srijuntongsiri S. *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* septicemia in an infant: a case report. *J Infect Dev Ctries.* 2012;6:584-7.

72. Rennie RP, Brosnikoff C, Shokoples S, Reller LB, Mirrett S, Janda W, Ristow K, Krilcich A. Multicenter evaluation of the new Vitek 2 *Neisseria-Haemophilus* identification card. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2681-5.
73. Rivera M, Hunter GC, Brooker J, O'Berg CW, Smythe SH, Bernhard VM. Aortic graft infection due to *Pasteurella haemolytica* and group C  $\beta$ -hemolytic *Streptococcus*. *Clin Infect Dis.* 1994;19:941-3.
74. Seijo A, Monroig J, Romer Y, Coto H. Análisis clínico y epidemiológico de mordeduras de rata en Buenos Aires. *Medicina (Buenos Aires).* 2009;69:259-64.
75. Sheng W, Hsueh P, Hung C, Teng L, Cheng Y, Luh K. Clinical features of patients with invasive *Eikenella corrodens* infections and microbiological characteristics of the causative isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001;20:231-6.
76. Sönksen UW, Christensen JJ, Nielsen L, Hesselbjerg A, Hansen DS, Bruun B. Fastidious gram-negatives: identification by the Vitek 2 *Neisseria-Haemophilus* card and by partial 16S rRNA gene sequencing analysis. *Open Microbiol J.* 2010;4:123-31.
77. Takeda S, Arashima Y, Kato K, Ogawa M, Kono K, Watanabe K, Saito T. A case of *Pasteurella haemolytica* sepsis in a patient with mitral valve disease who developed a splenic abscess. *Scand J Infect Dis.* 2003;35:764-5.
78. Vay C, Almuzara M, Barberis C, Rodríguez C, Togneri A, Mattera J, Famiglietti A. Actividad de 14 antimicrobianos sobre *Eikenella corrodens*. *Rev Argent Microbiol.* 2002;34:230-4.
79. Vay C, Sadorin R, Rodríguez H, Vujacich P, Famiglietti A. *Actinobacillus ureae* aislado en un paciente con bronquitis crónica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1995;13:569-70.
80. Vidal-Lampurduanes C, Dueñas J, Hervás D, Reina C, Gil J, Hervás JA. *Cardiobacterium hominis* is a rare cause of neonatal sepsis. *Pediatr Infect Dis J.* 2012; 31:541-2.
81. Wang HK, Chen YC, Teng LJ, Hung CC, Chen ML, Du SH, Pan HJ, Hsueh PR, Chang SC. Brain abscess associated with multidrug-resistant *Capnocytophaga ochracea* infection. *J Clin Microbiol.* 2007;45:645-7.
82. Watanabe T, Sato M, Abe T, Oda Y. Bacterial croup caused by *Pasteurella haemolytica*. *Acta Paediatr Jpn.* 1998;40:360-1.
83. Watkin RW, Baker N, Lang S, Ment J. *Eikenella corrodens* infective endocarditis in a previously healthy non-drug user. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002;21:890-1.

84. Westling K, Vondracek M. *Actinobacillus (Aggregatibacter) actinomycetemcomitans* (HACEK) identified by PCR/16S rRNA sequence analysis from the heart valve in a patient with blood culture negative endocarditis. *Scand J Infect Dis.* 2008;40:981-3.
85. Whitehouse RL, Jackson H, Jackson MC, Ramji MM. Isolation of *Simonsiella* sp. from a neonate. *J Clin Microbiol.* 1987;25:522-5.
86. Wilson BA, Ho M. *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26:631-55.
87. Yagupsky P. *Kingella kingae*: from medical rarity to an emerging pediatric pathogen. *Lancet Infect Dis.* 2004;4:358-67.
88. Yagupsky P, Bar-Ziv Y, Howard CB, Dagan R. Epidemiology, etiology, and clinical features of septic arthritis in children younger than 24 months. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 1995;149: 537-40.
89. Yagupsky P, Dagan R, Howard CW, Einhorn M, Kassis I, Simu A. High prevalence of *Kingella kingae* in joint fluid from children with septic arthritis revealed by the BACTEC blood culture system. *J Clin Microbiol.* 1992;30:1278-81.
90. Yagupsky P, Porsch E, St Geme JW. *Kingella kingae*: an emerging pathogen in young children. *Pediatrics* 2012; 127:557-65.
91. Yaneza AL, Jivan H, Kumari P, Togoo MS. *Pasteurella haemolytica* endocarditis. *J Infect.* 1991;23:65-7.
92. Zbinden R. *Aggregatibacter, Capnocytophaga, Eikenella, Kingella, Pasteurella*, and other fastidious or rarely encountered gram-negative En: Jorgensen JH, Pfaller A, Carroll KC, Landry ML, Funke G, Richter S, Warnock DW, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 11th ed., Washington D.C., ASM Press, 2015, p.652-66.

## **Capítulo II.c.4.3**

### ***Bordetella***

**DANIELA HOZBOR**

Laboratorio VacSal

Instituto de Biotecnología y Biología Molecular IBBM Facultad de Ciencias Exactas,  
Universidad Nacional de La Plata

**LUIS PIANCIOLA**

Laboratorio Central. Subsecretaría de Salud de Neuquén

**CLAUDIA LARA**

Servicio de Bacteriología Clínica

INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, Ciudad Autónoma de Buenos Aires

**DANIELA BOTTERO**

Laboratorio VacSal

Instituto de Biotecnología y Biología Molecular IBBM Facultad de Ciencias Exactas,  
Universidad Nacional de La Plata

## Aspectos taxonómicos y descripción del género

El género *Bordetella* pertenece a la familia *Alcaligenaceae* (orden *Burkholderiales*, clase *Betaproteobacteria*) que incluye entre otros a los géneros *Alcaligenes* y *Achromobacter*<sup>41</sup>. Los microorganismos que pertenecen a este género son cocobacilos gram negativos de 1 a 2  $\mu\text{m}$ , aerobios estrictos que emplean a los aminoácidos como fuente de carbono, nitrógeno y energía. La temperatura óptima de crecimiento de estos microorganismos es de 35 °C a 37 °C. Todos son catalasa positivos, ninguno es esporulado y solo algunos son móviles por medio de flagelos peritricos<sup>2</sup>. Son sensibles a sulfuros y ácidos grasos por lo que los medios de cultivo incluyen sangre y/o carbón activado. En estos medios se necesitan de 3 a 6 días para visualizar las colonias debido a que en general son de crecimiento lento. También pueden crecer en un medio sintético que incluya tampones, sales, aminoácidos y factores de crecimiento como nicotinamida.

En la Tabla 1 se detallan las especies que componen el género *Bordetella*.

**Tabla 1.** Especies del género *Bordetella*.

Especies	Rango de huésped/fuente	Enfermedad	Referencia bibliográfica
<i>B. pertussis</i>	Humanos	Coqueluche	(11)
<i>B. parapertussis</i> <sub>hu</sub> <i>/B. parapertussis</i> <sub>ov</sub>	Humanos/oveja	Coqueluche/neumonía	(25, 30, 84)
<i>B. bronchiseptica</i>	Mamíferos	Enfermedades respiratorias	(4, 9, 40, 45)
<i>B. holmesii</i>	Humanos	Septicemia, tos	(108)
<i>B. avium</i>	Pájaros	Rinotraqueítis	(104)
<i>B. trematum</i>	Humanos	Infecciones de heridas, otitis media	(22)
<i>B. hinzii</i>	Pollos/humanos	Infecciones oportunistas	(22)
<i>B. petrii</i>	Ambiente/humanos	Infecciones oportunistas	(105)
<i>B. ansorpii</i> *	Humanos	Infecciones oportunistas	(60)

\* propuesta como una especie diferente dentro del género *Bordetella*

Las especies *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis* conforman el grupo denominado “bordetelas clásicas” por ser las más estudiadas dentro del género<sup>5</sup>. La relación filogenética y la evolución de estas especies ha sido dilucidada con más detalle que para las otras especies de *Bordetella*<sup>80</sup>. Musser et al.<sup>75</sup> en base a los datos de MLEE (del inglés, *Multilocus Enzyme Electrophoresis*) concluyeron que estas tres especies presentan un bajo grado de diversidad si se las compara con otros patógenos. La limitada diversidad genética parece ser causada por un reciente cuello de botella evolutivo<sup>80</sup>. *B. pertussis* y *B. parapertussis* son considerados clones de *B. bronchiseptica* que se han especializado para infectar al ser humano.

Dentro del grupo de las bordetelas clásicas se han podido identificar mediante análisis de los datos de MLST (del inglés, *Multilocus Sequence Typing*) cuatro poblaciones bacterianas diferentes que se han designado como complejos I al IV. Los complejos I y IV comprenden aislados de *B. bronchiseptica*, mientras que los complejos II y III incluyen aislados de *B. pertussis* y *B. parapertussis<sub>hu</sub>* de origen humano, respectivamente<sup>27</sup>. Según los resultados difundidos por Diavatoupolus et al.<sup>27</sup>, *B. pertussis* y *B. parapertussis<sub>hu</sub>* habrían evolucionado a partir de los complejos IV y I, respectivamente, lo que indicaría que la adaptación de estas dos especies a los seres humanos se produjo a través de dos eventos independientes recientes. En dicho estudio se demostró además que *B. parapertussis<sub>hu</sub>* (de origen humano) y *B. parapertussis<sub>ov</sub>* (de origen ovino) derivan claramente de grupos ST (del inglés *Sequence Type*) diferentes del complejo I.

Los integrantes de la especie *B. bronchiseptica* que pertenecen al complejo IV estarían más estrechamente relacionados a *B. pertussis* que los incluidos en el complejo I<sup>27</sup>. Casi todos los aislamientos del complejo IV fueron obtenidos de

pacientes que presentaban sintomatología compatible con la enfermedad denominada coqueluche o pertussis y la mayoría contiene una secuencia de inserción (IS) *IS1663* no encontrada en otros linajes. Los aislamientos de *B. bronchiseptica* obtenidos principalmente de humanos pertenecientes al complejo IV muestran la misma diversidad que los aislamientos de *B. bronchiseptica* del complejo I, es decir que parecerían ser aislamientos más antiguos que los de *B. pertussis*.

En la evolución de *B. pertussis* y *B. parapertussis* a partir del complejo I de *B. bronchiseptica*, la adquisición de genes parece ser un evento raro.

*B. holmesii* por su parte, fue ubicada como una especie más estrechamente relacionada a *B. avium* y no a *B. pertussis* según lo indicaron los análisis realizados sobre la composición de los ácidos grasos, la caracterización de un *locus* denominado *bvgAS* (*Bordetella virulence genes*) y la secuencia de distintos genes que codifican para funciones básicas de las bacterias<sup>28</sup>. Esta especie del género *Bordetella* ha sido recuperada de muestras de sangre, fluido pleural y esputo de pacientes inmunocomprometidos<sup>67, 92, 93</sup>, aunque recientemente se la ha podido aislar también de las secreciones nasofaríngeas de pacientes con sintomatología compatible con coqueluche (también llamada pertussis o tos convulsa pertussis)<sup>15</sup>.

114.

*B. avium*, por su parte, también causa enfermedades respiratorias pero en aves<sup>58</sup>. Esta especie se ha aislado también de pacientes que sufren de otitis media crónica. *B. avium* al igual que *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* presenta tropismo por el epitelio ciliado del huésped y expresa una serie de adhesinas que juegan un rol esencial en las primeras etapas de la infección.



*B. trematum* se ha aislado de heridas y de oídos infectados<sup>104</sup>. Son poco conocidos sus factores de virulencia aunque se ha podido detectar en su genoma la presencia del locus *bvgAS* involucrado en la regulación de la síntesis de los factores de virulencia en las otras especies.

*B. hinzii* ha sido aislada tanto de aves como de humanos<sup>38</sup>. Esta especie es un patógeno oportunista en pacientes inmunocomprometidos. En ellos se la ha podido aislar de distintos sitios anatómicos (por ejemplo, tracto respiratorio, sangre y bilis)<sup>6, 21, 22</sup>. *B. hinzii* es capaz de expresar la toxina adenilato ciclasa también presente en otras especies del género. En esta especie se ha detectado también la presencia de la secuencia codificante para BvgA.

*B. petrii* fue aislada de un biorreactor que contenía sedimento de río<sup>105</sup>. Esta especie es la primera del género que fue aislada del medio ambiente. También se la ha podido aislar de pacientes con osteomielitis mandibular y con fibrosis quística<sup>35</sup>.

Respecto de *B. ansorpii*, sólo una publicación hace referencia a esta especie. Fue aislada de un exudado purulento obtenido de un quiste epidérmico en una paciente inmunodeprimida<sup>60</sup>. Dada su estrecha relación con *B. petrii* se cree que *B. ansorpii* es también una especie que puede sobrevivir en el medio ambiente.

Recientemente se han aislado de la superficie de la pared de yeso de una pintura mural en Nara, Japón, tres nuevas especies del género *Bordetella*: *Bordetella muralis* sp. nov., *Bordetella tumulicola* sp. nov. y *Bordetella tumbae* sp. nov.<sup>96</sup>. Estos hallazgos apoyan la evidencia previa de que algunas especies de *Bordetella* existen en el medio ambiente y pueden encontrarse en el suelo y/o en el agua.

## Factores de virulencia

Las distintas especies patógenas del género expresan factores que se conocen en conjunto como factores de virulencia. En el caso del grupo de las bordetelas clásicas, estos factores de virulencia han sido ampliamente estudiados. Los mismos han sido clasificados en dos categorías funcionales diferenciales: adhesinas y toxinas, aunque también existen sistemas más complejos como el sistema de secreción tipo III que también juegan un rol clave en la patogénesis<sup>16, 63</sup>. Así, mientras que las adhesinas median la adhesión al epitelio ciliado, a macrófagos y a neutrófilos, las toxinas son conocidas por contribuir a la patogénesis y en muchos de los casos estar involucradas en la evasión de la respuesta inmune montada por el huésped.

Las características más relevantes de los distintos factores de virulencia se describen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Características estructurales y funcionales relevantes de los principales factores de virulencia de *Bordetella* spp.

Denominación	Características estructurales y funcionales relevantes
Hemaglutinina filamentosa (FHA)	Es una proteína altamente inmunogénica, incluida en las vacunas acelulares (o de componentes) contra <i>B. pertussis</i> . Se ha demostrado que FHA está implicada en la colonización traqueal, en la adherencia y la invasión de <i>B. pertussis</i> a macrófagos y células epiteliales aunque también se cree que tiene funciones inmunomodulatorias <sup>1, 55</sup> . <i>B. parapertussis</i> y <i>B. bronchiseptica</i> expresan proteínas estrechamente relacionadas <sup>48, 102</sup> .
Fimbrias (Fim)	Son estructuras filamentosas de naturaleza proteica que se extienden desde la superficie bacteriana y participan en la adhesión a distintas células del huésped <sup>80</sup> . Los distintos aislamientos clínicos y las distintas cepas de <i>B. pertussis</i> pueden expresar distintos tipos de fimbrias en su superficie (Fim2 o Fim3 o ambas).

Denominación	Características estructurales y funcionales relevantes
Pertactina (PRN)	Es una proteína de la familia de las proteínas auto-transportadoras que está presente en la membrana externa de las especies clásicas del género. Participa en el proceso de adhesión de la bacteria al huésped <sup>78, 79</sup> . Se ha demostrado que esta proteína tiene un rol relevante no solo en la patogenicidad de las tres especies sino en la protección contra la enfermedad. También es otro de los componentes proteicos de algunas de las vacunas acelulares en uso <sup>18, 56</sup> . En el caso de coqueluche, los altos títulos de anticuerpos contra PRN asociados a los de toxina pertussis o a los de fimbrias en general han sido correlacionados con la protección contra las formas severas de la enfermedad <sup>19, 64, 81, 107</sup> . Además de la PRN se han descrito otras proteínas autotransportadoras como BrkA (del inglés <i>Bordetella resistance killing</i> ) <sup>36</sup> , el factor de colonización traqueal (TcfA) y el producto del gen regulado por el sistema BvgAS, Vag8. A estas proteínas se les ha adjudicado un rol durante el proceso infectivo <sup>32, 94</sup> .
Toxina pertussis (PTx)	Este factor de virulencia es sintetizado exclusivamente por <i>B. pertussis</i> . A esta toxina del tipo AB5 se le han atribuido la mayor parte de los síntomas de coqueluche <sup>78</sup> . También se le adjudica la linfocitosis en sangre periférica. Dado su poder inmunogénico y protector <sup>29</sup> , la toxina pertussis fue el primer antígeno purificado que se incorporó en las formulaciones de vacunas acelulares.
Adenilato ciclasa-hemolisina (AC-Hly)	Es uno de los principales factores de virulencia no sólo de <i>B. pertussis</i> sino también de otras especies del género que infectan a los mamíferos. Esta toxina presenta dos tipos de actividades, la actividad adenilato ciclasa (AC) y la de hemolisina (Hly) <sup>78</sup> . La actividad AC le permite a <i>B. pertussis</i> afectar las funciones fisiológicas de la célula eucariota, mediante la síntesis descontrolada de cAMP a partir de ATP y activada por calmodulina. Por otra parte, mediante el dominio con actividad Hly, es capaz de formar canales selectivos de cationes en las membranas eucariotas.
Toxina dermonecrótica (TDN)	Se la ha denominado así por su capacidad de producir lesiones necróticas en la piel cuando se la inyecta subcutáneamente en animales de experimentación como conejos, ratones y cobayos <sup>104</sup> .
Toxina citotraqueal (TCT)	Esta toxina produce la citopatología característica de la infección de <i>B. pertussis</i> sobre células ciliadas en tejido traqueal. Esta toxina también actúa sobre otras células, inhibe la quimiotaxis y el metabolismo oxidativo de neutrófilos, lo cual podría contribuir a la persistencia de <i>B. pertussis</i> en el huésped <sup>81</sup> .
Lipopolisacárido (LPS)	Es una molécula anfifílica localizada en la membrana externa de las bacterias gram negativas. El rol del LPS en la patogénesis estaría relacionado con el proceso de colonización <sup>55</sup> .
Sistemas de secreción de Tipo III (TTSS)	Este sistema está compuesto por una estructura proteica compleja del tipo de jeringas inyectoras con capacidad de traslocar proteínas efectoras directamente en el citoplasma o en la membrana de células eucariotas <sup>46, 79, 106</sup> .

La expresión de la mayoría de los factores de virulencia mencionados está regulada por un sistema de dos componentes denominado BvgAS <sup>23</sup>. Los sistemas de dos componentes permiten a los organismos que los poseen montar respuestas adaptativas frente a los estímulos ambientales cambiantes a los que se enfrentan dentro de su ciclo de vida. En el caso particular del género *Bordetella*, el sistema de transducción de señales BvgAS codificado en un único *locus* denominado *bvg*, controla la expresión de genes asociados directamente con la patogénesis <sup>24</sup>. Este sistema de dos componentes fue identificado por Weiss y colaboradores en 1989 <sup>107</sup> cuando observaron que la inserción del transposón *Tn5* dentro del mismo, eliminaba simultáneamente la síntesis de las proteínas PTx, FHA, AC-Hly y TDN (cuyos genes se denominan *vag* por *v*irulence *a*ctivated *g*enes). Posteriormente se demostró que la pertactina también es una proteína regulada por *bvg*. Estas bacterias que tienen suprimida la expresión coordinada de los genes *bvg*-activados poseen menor capacidad para causar la enfermedad y por ello se las designa como bacterias avirulentas. Mutaciones espontáneas en el *locus bvg* pueden llevar también a las bacterias al estado de avirulencia <sup>23, 24</sup>. A este fenómeno irreversible se lo ha denominado cambio de fase y se refiere a la aparición de variantes avirulentas que no expresan los factores de virulencia antes descritos pero sí expresan otra serie de proteínas cuyo rol hasta hoy no ha podido ser dilucidado. Otro fenómeno mediado por el *locus bvg* es la denominada modulación fenotípica que a diferencia del cambio de fase, se trata de una alternancia reversible entre las fases virulentas y avirulentas (también designadas como Bvg<sup>+</sup> o Bvg<sup>-</sup> respectivamente). La modulación fenotípica ocurre en respuesta a ciertas señales del entorno a las que se denominan moduladores. Hasta el presente solo se conocen señales que ejercen su acción *in vitro*, ellas son: bajas temperaturas, presencia de MgSO<sub>4</sub> o ácido nicotínico en el

medio de cultivo. En ausencia de cualquiera de estas señales las proteínas de BvgAS regulan positivamente la expresión de los genes que codifican para los factores de virulencia y negativamente los genes que se denominan *vrg* (del inglés *vir repressed genes*). En realidad, la modulación de fase no se trata de un proceso de todo o nada sino que hay una variación continua de expresión de genes en cuyos extremos se encuentra la fase virulenta por un lado y la fase avirulenta por otro. De hecho, recientemente se ha descrito y caracterizado una tercera fase denominada fase intermedia o Bvg<sup>i</sup> que se obtiene al emplear determinadas concentraciones de los agentes moduladores <sup>56</sup>.

## **Coqueluche, tos convulsa o pertussis: enfermedad, transmisión y epidemiología**

De las tres especies clásicas del género *Bordetella*, *B. pertussis* es la de mayor relevancia epidemiológica. Esta especie es capaz de causar en el hombre una enfermedad respiratoria aguda altamente contagiosa conocida como tos convulsa, pertussis o coqueluche. La principal manifestación clínica de coqueluche es la tos prolongada con intensos ataques de tos (tos paroxística) que a menudo terminan en una inspiración profunda y sonora. La enfermedad es más grave en lactantes y niños pequeños, en los que puede ocasionar la muerte.

Las complicaciones más importantes son respectivamente para niños menores de 6 meses y para mayores de 20 años de edad: la hospitalización (72,2% y 3,9%), bronconeumonía (17,3% y 3,4%), convulsiones (2,1% y 0,5%), encefalopatía aguda (0,5% y 0,1%), daño cerebral permanente y muerte <sup>29, 65</sup>. En países como Alemania se ha informado que las complicaciones aparecen con una

tasa del 5,8% y la neumonía es la complicación más frecuente (29%). En general se estima que alrededor de 1 de cada 10 niños con pertussis desarrollan neumonía, alrededor de 1 cada 50 padecen convulsiones y cerca de 1 de cada 250 personas que se infectan desarrollan encefalopatía y en los casos de peor evolución ocurre el fallecimiento del paciente. Los adultos y adolescentes pueden infectarse y presentar tanto síntomas leves como la típica tos paroxística prolongada. En todas las personas, la tos puede persistir durante meses.

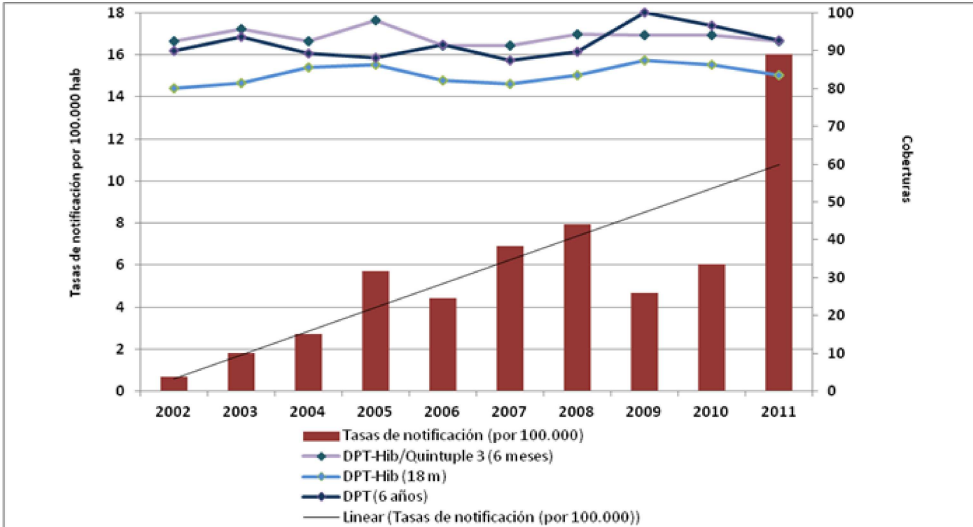
Dado que coqueluche es una enfermedad con alta contagiosidad y mortalidad, la medida de control más importante para la enfermedad es la vacunación. En la actualidad existen dos tipos de vacunas contra la enfermedad: vacunas celulares (wP) constituidas por suspensiones del agente causal muerto por calor y detoxificado y vacunas acelulares (aP) formuladas a partir de componentes proteicos purificados. En este punto es importante recordar que la utilización de las diferentes formulaciones no es indistinta, sino que la recomendación de su aplicación depende, entre otros factores, de la edad del individuo a inmunizar. Así, para la población menor de 7 años de edad pueden emplearse vacunas celulares y vacunas acelulares de formulación pediátrica. Estas últimas, al igual que las vacunas celulares, pueden presentarse combinadas con otras vacunas además del componente tetánico y diftérico (en este caso se la designa como DTaP) por ejemplo Hib o IPV. Para la población mayor de 7 años no se recomienda el uso de vacunas celulares para el componente pertussis. En estos casos, se indica el uso de vacunas acelulares, las que también se presentan combinadas con otras vacunas como por ejemplo la del tétanos y la difteria. Es importante destacar que las formulaciones acelulares para adolescentes y adultos contienen una dosificación menor tanto del componente pertussis (específicamente de la toxina pertussis) como del

componente diftérico, comparadas con las formulaciones acelulares pediátricas. Por ello, y para diferenciarlas de las pediátricas, se las designa con letras minúsculas. Es así que las vacunas en sus componentes diftérico y pertussis en dosificación para adultos se designa d y ap respectivamente, y combinadas con tétanos se designan dTap. A pesar de la existencia de vacunas y planes de vacunación masiva desde hace más de 50 años, la tos convulsa continúa siendo un problema de salud vigente. Obviamente que la situación sería mucho peor si no se utilizaran en tiempo y forma las actuales vacunas y por ello es importante tener presente el calendario de vacunación para no perder oportunidades.

En las dos últimas décadas se ha producido un aumento sostenido de casos de coqueluche con tasas que son preocupantes<sup>70</sup>. Varios son los países que han registrado esta situación entre ellos Holanda, Bélgica, España, Alemania, Francia, Australia, Canadá, Estados Unidos y Argentina <sup>17, 18, 20, 31, 54, 73, 90</sup>. En los Estados Unidos, por ejemplo, el número de casos anuales notificados durante el período 1990 -1999 varió entre 4.570 y 7.298; pero ya en el año 2005 se registraron 25.619 casos y en el 2012, 48.277 casos. En ese año ocurrieron 20 fallecimientos de bebés de menos de 3 meses de edad debidos a pertussis. La tasa de incidencia de la enfermedad en bebés superó a la de todos los otros grupos de edad. Se observaron tasas también altas en niños de 7 a 10 años y en adolescentes de 13 y 14 años (<http://www.cdc.gov/pertussis/surv-reporting/cases-by-year.html>). En el año 2013 los casos notificados para el total del país se redujeron prácticamente a la mitad (24.231), pero en varios estados como el de Washington, D.C. se reportó un aumento con respecto a los del año 2012.

En la Argentina, por su parte, a partir del año 2003 se detectó un aumento sostenido de casos (Figura 1). Así para el año 2011 se registró la tasa más alta:

16/100.000 habitantes. En dicho año también se detectó el mayor número de fallecimientos asociados a la enfermedad (N = 76). Todas las muertes ocurrieron en el grupo de menores de 1 año. Entre 2002 y 2011, las coberturas de vacunación anti-pertussis a nivel nacional para la tercera dosis de la serie primaria y para la correspondiente al ingreso escolar estuvieron por encima del 90%, mientras que el refuerzo de los 18 meses presentó coberturas entre 80 y 90% (Figura 1, líneas azul, celeste y gris). El refuerzo de los 11 años, incluido en el calendario desde 2009, tuvo una cobertura del 54,6% y 72,8% en los años 2010 y 2011 respectivamente. La situación epidemiológica de la enfermedad en nuestro país y en otros ha mostrado que ésta representa en la actualidad un problema grave para la salud.



**Figura 1.** Notificación de coqueluche y cobertura de vacunas en la Argentina entre los años 2002 y 2011



Las posibles causas hasta ahora esgrimidas para el importante aumento de las notificaciones de coqueluche hacen referencia a debilidades en las vacunas disponibles tanto de las vacunas celulares clásicas (wP) como de las vacunas acelulares (aP) más modernas: relativa baja efectividad, necesidad de muchas dosis con coberturas del 95% para lograr protección, pérdida de la inmunidad y adaptación del patógeno a la inmunidad conferida por las vacunas<sup>61</sup>. Parecería además que el cambio de la vacuna celular por las vacunas acelulares ha complicado la situación de la enfermedad, debido probablemente a que la respuesta inmune inducida por las vacunas aP es menos robusta que la inducida por las vacunas wP. Esto pudo evidenciarse en el modelo no humano de primates recientemente desarrollado, en donde se observó que las vacunas aP protegen contra la enfermedad, pero no son capaces de prevenir ni la infección ni la transmisión <sup>106</sup>. Estos hallazgos son consistentes con el conocimiento de que las vacunas aP inducen una respuesta Th2 y también Th17 que es menos eficaz que la fuerte respuesta Th1 inducida por la infección natural o por la vacuna wP <sup>91</sup>. Además de la disminución de la inmunidad inducida por la vacunación, se están describiendo como posibles causales del resurgimiento a los cambios en las características antigénicas y genotípicas de las cepas de *B. pertussis* circulantes: los alelos de los antígenos que se incluyen en las vacunas y los expresados por bacterias circulantes que difieren entre sí <sup>7</sup>. La aparición de aislamientos bacterianos divergentes a los contenidos en las vacunas parece reflejar el efecto de la presión selectiva ejercida por la vacunación. En algunos, pero no en todos los países, la aparición de variantes alélicas coincide temporalmente con el resurgimiento de la enfermedad.

Respecto de la adaptabilidad de *B. pertussis* a la inmunidad conferida por las vacunas, el grupo de Mooi y colaboradores, en Holanda fue el primero en describir

que varias secuencias que codifican para inmunógenos protectores, como la toxina pertussis, la pertactina y las fimbrias, presentan variantes alélicas características de cada período epidemiológico. Estos resultados preocupantes marcaron la necesidad de estudiar la evolución de este patógeno, no solo en términos de la extensión de la biodiversidad génica, sino en términos funcionales respecto de la implicación de la misma en la protección y control de la enfermedad. Los hallazgos hasta ahora descritos sobre la divergencia bacteriana permitieron plantear la hipótesis sobre la presión de selección que la vacunación estaría ejerciendo sobre las cepas cuyas variantes alélicas estarían más adaptadas a superar la respuesta inmune generada por el hospedador <sup>72</sup>.

En la Argentina se ha trabajado en la tipificación de las cepas circulantes y los resultados hasta ahora alcanzados han permitido observar que los alelos predominantes en las cepas vacunales (*prn1* o *prn7*, *ptxA2* o *ptxA4* y *fim 2-1* o *fim3A*) han sido reemplazados en la población bacteriana circulante por *prn2* o *prn3*, *ptxA1* y *fim 2-2* o *fim3B* <sup>13, 14, 33, 39</sup>.

Más recientemente, han aparecido en varios países aislamientos bacterianos que no expresan uno o más componentes antigénicos que están contenidos en las formulaciones vacunales contra pertussis, en particular la pertactina <sup>64, 81</sup>. La aparición de aislamientos deficientes en pertactina exclusivamente en las regiones donde las vacunas aP son las únicas utilizadas, sugiere que la vacunación con la vacuna aP resultó en la expansión de cepas que tenían una ventaja selectiva en las poblaciones humanas vacunadas.

En la actualidad se están llevando a cabo estudios funcionales para evaluar la implicación de esta divergencia en la protección.

Más allá de las causas, el aumento por demás significativo en el número de casos de coqueluche ha obligado al sistema de salud a revisar e incluso implementar nuevas estrategias para mejorar el control de esta enfermedad. Así, por ejemplo, con el objetivo de disminuir la incidencia en la población más vulnerable representada por los niños menores de 1 año de edad se ha recomendado e implementado la vacunación en capullo o la vacunación del personal de salud en contacto con los niños o la inmunización durante el embarazo o la adición de un refuerzo (*booster*) a los adolescentes. Pero aún hoy se discute cuál de estas estrategias implementar y cuál tiene una mayor probabilidad de éxito.

Más allá de estas preguntas, sin dudas es necesario utilizar de la mejor manera posible las actuales formulaciones vacunales, mantener coberturas altas de las mismas y no perder oportunidades, pues, en caso contrario, la situación de coqueluche sería aún peor.

## **Diagnóstico**

El diagnóstico clínico de coqueluche se realiza de acuerdo a criterios recomendados por la Organización Mundial de la Salud WHO-Pertussis Surveillance que según lo establecido en el año 2000, define como caso clínico a aquel que es diagnosticado por el médico o el que presenta una tos persistente de al menos 2 semanas con al menos uno de los siguientes síntomas: paroxismos (es decir, ataques) de tos, estridor inspiratorio y vómitos después de toser sin otra causa aparente <sup>110</sup>. En la Argentina, en base a los criterios de la OMS, se han

consensuado a partir de 2010 las definiciones según la edad del paciente incluidas en la tabla 3.

Los criterios para la confirmación de laboratorio son: el aislamiento del agente causal o detección de secuencias genómicas específicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o serología positiva empleando sueros pareados. De acuerdo a los datos clínicos, epidemiológicos y laboratoriales los casos se clasifican según se indica en la tabla 4.

**Tabla 3.** Definición clínica de caso empleada en Argentina a partir de 2010

Edad del paciente	Definición clínica
Menores de 6 meses	Toda infección respiratoria aguda, con al menos uno de los siguientes síntomas: apnea, cianosis, estridor inspiratorio, vómitos después de toser o tos paroxística.
Mayores de 6 meses hasta 11 años	Tos de 14 o más días de duración acompañada de uno o más de los siguientes síntomas: tos paroxística, estridor inspiratorio o vómitos después de la tos, sin otra causa aparente.
Mayores de 11 años	Tos persistente de 14 o más días de duración, con o sin otra sintomatología acompañante.

Un diagnóstico temprano y un tratamiento oportuno sin dudas ayudan a controlar la diseminación de la enfermedad. Cuando se presenta un caso clínico típico se debería proceder sin esperar la confirmación del laboratorio. Sólo cuando la sospecha clínica del caso no es tan clara, la investigación podría esperar hasta tener

la confirmación por el laboratorio. Sin embargo la profilaxis de los lactantes y sus contactos debería hacerse rápidamente ya que los mismos presentan el mayor riesgo de hospitalización y muerte como consecuencia de la enfermedad.

**Tabla 4.** Clasificación de casos de coqueluche

Clasificación	Descripción
Caso confirmado	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Paciente con infección respiratoria que presenta tos de cualquier duración y con cultivo positivo para el agente causal.</li> <li>- Paciente con clínica compatible de coqueluche y resultados positivos en el laboratorio mediante ensayos de PCR específicos.</li> <li>- Paciente con clínica compatible de coqueluche y resultados positivos en el laboratorio mediante ensayo serológico específico.</li> <li>- Paciente con clínica compatible de coqueluche y nexo epidemiológico con caso confirmado por laboratorio.</li> </ul>
Caso probable	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Paciente con clínica compatible con coqueluche y sin confirmación por laboratorio (no estudiado o resultados de laboratorio no conclusivos) y sin nexo epidemiológico con un caso confirmado por laboratorio.</li> <li>- Paciente con clínica incompleta o datos insuficientes y con resultado positivo por PCR o por seroconversión.</li> </ul>
Caso descartado	Clínica incompleta o datos insuficientes, con resultado de laboratorio negativo y sin nexo epidemiológico con un caso confirmado.

Comentario. El diagnóstico por laboratorio puede ser negativo aun cuando el paciente tenga una infección por coqueluche. La definición clínica de caso es apropiada para los períodos endémicos o para casos esporádicos. En los brotes, la definición de caso puede ser menos sensible e incluir tos de larga duración pero sin otros síntomas. Para los mayores de 1 año, la definición de caso que describe la duración de la tos en 14 días o más en brote, ha demostrado tener un 84% sensibilidad y 63% de especificidad para la detección por cultivo.

La vigilancia de coqueluche no debe restringirse solo al caso ya que es una enfermedad de alta contagiosidad: el 90% de los individuos susceptibles de contraer

la enfermedad que están en contacto con un caso de coqueluche, pueden contraer la enfermedad. Es por ello que coqueluche es un problema de la salud pública. Los datos que se colectan en la vigilancia además son importantes para estimar la carga de la enfermedad y para ser utilizados como base para el diseño de nuevas estrategias de control y para la evaluación de las mismas.

La confirmación de coqueluche en el laboratorio es importante porque otros patógenos pueden causar síntomas similares. El cultivo de *B. pertussis* es el diagnóstico más específico, todos los pacientes con tos y con cultivo deben reportarse como un caso confirmado, incluso en los casos en que la duración de la tos sea menor de 14 días.

El diagnóstico molecular basado en PCR es menos específico que el cultivo. Los casos que tienen un resultado positivo por PCR se consideran confirmados sólo si su clínica es compatible con la definición de caso.

La determinación de quién tiene coqueluche y quién no, suele ser difícil. Así es que siempre que sea posible, se debe tomar un hisopo o un aspirado nasofaríngeo de aquellos pacientes en los que se sospecha de coqueluche.

### **Recolección, transporte y conservación de las muestras clínicas**

Las muestras más recomendadas para realizar el diagnóstico por cultivo y por métodos moleculares (PCR) son el aspirado (ANF) o el hisopado nasofaríngeo (HNF) tomados de la nasofaringe posterior. Las muestras de ANF han mostrado mayor sensibilidad que el HNF. El hisopado nasofaríngeo debe ser tomado con hisopo flexible de dacrón, rayón o *nylon*. No resultan útiles para el cultivo las muestras tomadas con hisopo de algodón, ya que este material inhibe el desarrollo

de las especies de *Bordetella* debido a la acción de los ácidos grasos que contiene. Por otro lado, tampoco son adecuados los hisopos de alginato de calcio ya que resultan inhibidores de la reacción de PCR. Las muestras de hisopado nasal o de fauces resultan inaceptables debido a la baja recuperación del agente causal que presentan estos especímenes.

Los medios adecuados para el transporte de las muestras son el medio de Regan Lowe en concentración del 50% en relación al medio empleado para el cultivo. Otras opciones son el medio Amies modificado o la solución de casaminoácidos al 1%.

Para el diagnóstico serológico, las muestras recomendadas son los sueros pareados tomados en la fase aguda y convaleciente respectivamente (21 días de diferencia entre la primera toma y la segunda). En caso de realizarse un enzimoimmunoensayo (ELISA) para evaluar títulos de IgG antitoxina pertussis se utiliza un solo suero de fase aguda (luego de 2 semanas del inicio de la tos). Como no es posible diferenciar los anticuerpos inducidos por la vacunación de los de la infección, es importante que el diagnóstico serológico se realice sólo en pacientes en los que la vacunación anticoqueluche esté alejada temporalmente (al menos 2 años) de la toma de muestra. Los sueros deben conservarse en heladera hasta su derivación, la cual debe realizarse acompañada de la ficha epidemiológica.

### **Diagnóstico microbiológico**

El cultivo es la prueba de oro para el diagnóstico de coqueluche. Presenta una especificidad del 100%. El éxito en la recuperación del agente causal depende

de varios factores, entre ellos: la toma y el transporte adecuados de la muestra y la etapa de la enfermedad en que la muestra es recolectada. La sensibilidad del cultivo es mayor durante la fase catarral y comienza a disminuir durante la primera mitad de la fase paroxística. También influyen en la recuperación el uso de antimicrobianos previo a la toma de muestra (empleo de macrólidos o trimetoprima-sulfametoxazol), la inmunidad conferida por una infección pasada o por la vacunación y la edad del paciente (se observan bajas tasas de recuperación en personas vacunadas y/o en personas mayores) <sup>97, 100</sup>. Se ha informado una sensibilidad de hasta aproximadamente el 60% en niños con vacunación incompleta y con escasos días de duración de los síntomas<sup>109</sup>.

*B. pertussis* requiere condiciones especiales para lograr su recuperación. Los medios aptos para el cultivo de estas especies son el agar Bordet Gengou y/o el medio Regan Lowe suplementado con sangre de carnero o caballo en concentración de 7 a 15 % (Fig. 2). Estos medios contienen complejantes de sustancias inhibitorias del crecimiento como lo son los ácidos grasos presentes en las secreciones nasofaríngeas, e incluso en los mismos medios de cultivo. Los cultivos deben incubarse a 35-37 °C, en aerobiosis y atmósfera de humedad del 7%. Las placas sembradas deben observarse durante al menos 10 días, antes de ser descartadas, ya que *B. pertussis* desarrolla a partir de las 72 h, pero puede demorar más tiempo en crecer, a causa de la microbiota acompañante o cuando la calidad del medio empleado no es óptima. Para inhibir el desarrollo de la microbiota acompañante y visualizar mejor las colonias de las especies de *Bordetella*, pueden emplearse placas de agar Bordet Gengou y/o de agar Regan Lowe con el agregado de cefalexina, en concentración final de 40 µg/ml<sup>109</sup>. En este caso es recomendable



sembrar en forma paralela las muestras clínicas en placas con y sin el agregado del antibiótico <sup>53</sup>.

Un aspecto a tener en cuenta es el tiempo de vida útil de los medios preparados empleados en el cultivo. El medio Regan Lowe puede ser almacenado durante 4 a 8 semanas, pero el medio Bordet Gengou solo puede ser almacenado durante una semana. El medio Regan Lowe permite una mayor recuperación de estos microorganismos ya que inhibe más eficazmente las sustancias tóxicas que el medio Bordet Gengou y por este motivo es recomendado por algunos autores <sup>6</sup>. La ventaja del agar Bordet Gengou es que permite visualizar la  $\beta$ -hemólisis característica de la fase virulenta de *B. pertussis* y *B. parapertussis*.



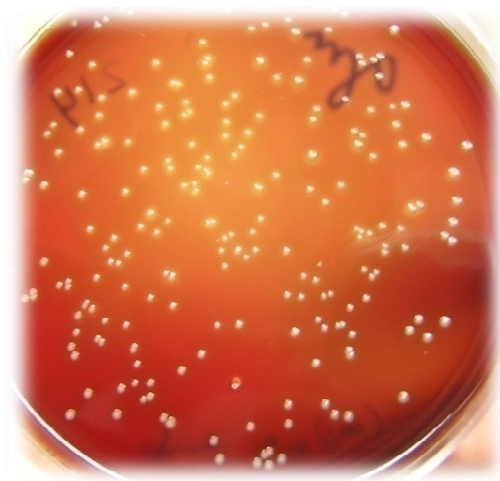
**Figura 2.** Medios de cultivo que se emplean para el cultivo de *B. pertussis*

Desde los Laboratorios Nacionales de Referencia de Argentina se recomienda el empleo del agar Regan Lowe (Fig. 3), para la siembra inicial de las muestras clínicas y posterior subcultivo de las colonias sospechosas en agar Bordet Gengou para la observación de la producción de hemólisis (Fig. 4). Las colonias compatibles

se examinan con la tinción de Gram y la realización de pruebas bioquímicas (Tabla 5).



**Figura 3.** Crecimiento de *B. pertussis* en el medio de Regan Lowe suplementado con 10% v/v de sangre desfibrinada de carnero



**Figura 4.** Crecimiento de *B. pertussis* en agar Bordet Gengou suplementado con 10% v/v de sangre desfibrinada de carnero

Cabe recordar que *B. holmesii*, si bien fue descrita como causante de bacteriemia, endocarditis y neumonía, especialmente en pacientes inmunocomprometidos o con asplenia <sup>79</sup>, también ha sido descrita en pacientes con sintomatología compatible con coqueluche, por lo cual debe considerarse su aislamiento a partir de las muestras de hisopado o aspirado nasofaríngeo <sup>77</sup>. Se encontró que la concentración de 40 µg/ml de cefalexina usada habitualmente en la preparación de los medios de Bordet Gengou y Regan Lowe puede inhibir el desarrollo de *B. holmesii*.

*B. holmesii*, *B. bronchiseptica*, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. petrii*, *B. trematum* y *B. ansorpii* desarrollan bien en medios tales como agar MacConkey, agar sangre y agar Columbia.

*B. pertussis* y *B. parapertussis* pueden ser identificadas también mediante el empleo de pruebas de aglutinación con antisueros específicos. Para la interpretación de estas pruebas deben usarse cepas de referencia como controles positivos. Para considerar un resultado positivo la aglutinación debe ser franca.

Debido a las exigencias culturales de *B. pertussis* y *B. parapertussis*, estas especies no pueden ser identificadas mediante los sistemas microbiológicos automatizados empleados habitualmente en los laboratorios clínicos. Por otro lado, los sistemas tales como Vitek 2 (bioMérieux) sólo incluyen en su base de datos a *B. bronchiseptica* y *B. trematum*, mientras que los sistemas MicroScan (Siemens Healthcare Diagnostics) y Phoenix (Becton Dickinson) solo incluyen en sus bases de datos a *B. bronchiseptica*.

Cabe destacar que las especies *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii* y *B. bronchiseptica* pueden ser identificadas mediante el uso de distintos algoritmos de reacciones de PCR los cuales serán luego detallados.

La identificación microbiológica basada en la secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S es una metodología que está adquiriendo mayor utilidad, sobre todo para aquellos casos en que la identificación fenotípica resulte imposible, difícil o requiera de mucho tiempo. En la actualidad se está empleando para *B. hinzii*, *B. avium* y *B. ansorpii*<sup>34, 51, 57</sup>.

### **Ensayos de inmunofluorescencia directa**

Los ensayos de inmunofluorescencia directa (DFA) todavía se siguen utilizando en algunos lugares aunque no se recomienda su uso ya que su especificidad es variable.

### **Diagnóstico molecular**

Los métodos moleculares de diagnóstico son entre 2 y 6 veces más sensibles que el cultivo, lo cual depende de algunas variables como edad, estado vacunal y duración de los síntomas<sup>36, 89</sup>. Como ocurre con los cultivos, la sensibilidad de la PCR disminuye con los días de evolución de la patología. De todas formas, por su gran sensibilidad, puede ser una herramienta útil para el diagnóstico aún con 4 a 6 semanas de tos<sup>89</sup>. Como hemos mencionado anteriormente la muestra de elección es el aspirado nasofaríngeo o el hisopado nasofaríngeo. Eventualmente para pacientes adultos puede utilizarse también el esputo<sup>43</sup>.

**Tabla 5.** Características útiles para diferenciar las distintas especies del género *Bordetella*<sup>2-8</sup>

	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. avium</i>	" <i>B. ansorpii</i> "	<i>B. hinzii</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>B. petrii</i>	<i>B. trematum</i>
Crecimiento en:									
Medio RL	3-4 días	2-3 días	1-2 días	1-2 días	ND	2 días	2-3 días	ND	ND
Agar Columbia	-	V	+	+	+	+	+	+	+
Agar MacConkey	-	+ (lento)	+	+	+	+	+ (lento)	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	V	+	+
Oxidasa	+	-	+	+	-	+	-	+	-
Movilidad	-	-	+	+	+	+	-	-	+
Pigmento	-	marrón	-	-	-	-	marrón	amarillo	Amarillo
Reducción de nitratos	-	-	+	-	-	-	-	+	V
Ureasa	-	+ (24 hs)	+ (4 hs)	-	-	V	-	-	-
Utilización de citrato	-	-	V	V	+	+	-	+	+
Hemólisis en BG	+	+	V	V	ND	ND	-	-	ND

+: ≥ 90% de las cepas son positivas, -: ≤ 10% de las cepas son positivas, V: 10 a 89% de las cepas son positivas, ND: no determinado.

BG: Bordet Gengou

La extracción y purificación de ADN es necesaria para limitar la acción de los inhibidores presentes en la muestras <sup>89</sup>. Existen métodos caseros para la extracción de ADN, que paulatinamente están siendo reemplazados por métodos comerciales. Estos últimos están basados en el uso de resinas de intercambio iónico o en separación magnética usando partículas de sílica <sup>88</sup>. Ninguno de estos métodos está validado para la extracción de ADN de muestras respiratorias <sup>88</sup>.

Existen estudios que demuestran que en general los distintos métodos comerciales resultan adecuados para la extracción de ADN de estas muestras. También señalan que existe mucha variación entre los distintos métodos en lo que se refiere a sensibilidad y capacidad para remover sustancias inhibitorias <sup>88</sup>. Existen escasos estudios que comparen el rendimiento de los métodos caseros con los comerciales <sup>89</sup>.

Muchos laboratorios utilizan como blanco para el diagnóstico de *B. pertussis* a la secuencia de inserción *IS481* ya que al estar en más de 200 copias en el genoma del patógeno, permite el diseño de ensayos de PCR de alta sensibilidad <sup>69</sup>, <sup>89</sup>. Esta última característica es el origen de algunos resultados falsamente positivos causados por contaminaciones de laboratorio <sup>85</sup>. Por esta razón se recomienda no basar el diagnóstico molecular solo en la determinación de esta secuencia, sino evaluar conjuntamente otras secuencias blanco. La PCR basada en la *IS481* (Tabla 6) no es específica de *B. pertussis* ya que *B. holmesii* también da resultado positivo y eventualmente también lo hacen algunos aislamientos de *B. bronchiseptica* <sup>69</sup>, <sup>86</sup>, <sup>87</sup>. La secuencia promotora del gen de toxina pertussis (PTpr) puede usarse como blanco para el diagnóstico específico de *B. pertussis* <sup>36</sup>, <sup>37</sup>, <sup>44</sup>. Esta región presenta algunas mutaciones en *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*. Por esta razón el gen de toxina pertussis no se expresa en estas especies y algunas secuencias de esta

zona pueden utilizarse para el diagnóstico específico de *B. pertussis* <sup>78</sup>. Los laboratorios referenciales de coqueluche en la Argentina recomiendan realizar la PCR de *IS481*, que actuaría como el ensayo de mayor sensibilidad, combinada con la PCR PTpr para lograr mayor especificidad en el diagnóstico de *B. pertussis* <sup>68, 83</sup>.

Para *B. parapertussis* se usa la secuencia de inserción *IS1001* (Tabla 6) que existe en aproximadamente 20 copias por célula<sup>103</sup>. La especificidad de la PCR basada en *IS1001* para *B. parapertussis* es adecuada por lo que se ha difundido extensamente.

**Tabla 6:** Cebadores o *primers* utilizados en los distintos ensayos de PCR

Blanco	Cebadores	Secuencia (5' → 3')	Amplicón (pares de bases)	Referencia bibliográfica
PTpr	PTp1	CCAACGCGCATGCGTGCAGATTCGTC	191	(47)
	PTp2	CCCTCTGCGTTTTGATGGTGCCTATTTTA		
IS481	IS481f	GATTCAATAGGTTGTATGCATGGTT	187	<a href="http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/127891/1/WHO_IVB_14.03_eng.pdf">http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/127891/1/WHO_IVB_14.03_eng.pdf</a>
	IS481r	TTCAGGCACACAAACTTGATGGGCG		
IS1001	IS1001A	CGCCGCTITGATGACCTTGATA	481	(89)
	IS1001Z	CACCGCCTACGAGTTGGAGAT		
β-globina	BGf	CCAATCTGCTCACACAGGATAGAGAGGGCAGG	494	<a href="http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/127891/1/WHO_IVB_14.03_eng.pdf">http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/127891/1/WHO_IVB_14.03_eng.pdf</a>
	BGr	CCTTGAGGCTGTCCAAGTGATTCAGGCCATCG		

Se han utilizado otras secuencias con fines diagnósticos: el gen de FHA, el gen de PRN, el gen de la porina, etc. También existen ensayos de PCR en tiempo real, usando sondas de distintos tipos y dirigidos a la detección de distintas secuencias<sup>62, 85, 94, 95</sup>. No existen estudios concluyentes que comparen las diferencias en la sensibilidad y especificidad de las plataformas en tiempo real comparadas con las

PCR convencionales, aunque es de esperar una mayor especificidad de las primeras ya que cuentan con un paso adicional de hibridación con sondas. La diferencia entre ambas metodologías está dada por la reducción de la posibilidad de contaminación a favor de las PCR en tiempo real ya que en ella no se manipulan los amplicones. Los costos elevados de estas últimas técnicas son la desventaja principal de las mismas, lo que ha impedido hasta el momento la generalización de su uso en nuestro medio.

Como ocurre en otros casos en los que se usan métodos moleculares para el diagnóstico, es imprescindible un adecuado control de calidad de todo el proceso así como la participación en programas externos de control de calidad. Debe garantizarse a lo largo de todos los ensayos un adecuado nivel de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad <sup>66, 76</sup>. Es aconsejable asegurar también que no existan en la muestra sustancias capaces de inhibir la reacción de PCR. Para ello pueden utilizarse controles internos de amplificación (IAC), que son secuencias distintas a la secuencia blanco y que están presentes en la muestra o son agregadas a la misma <sup>52</sup>. Con este fin, puede utilizarse el ensayo de  $\beta$ -globina utilizando los cebadores que figuran en la Tabla 3.

### **Diagnóstico serológico**

El diagnóstico de coqueluche a través de la aplicación de metodologías serológicas constituye un método indirecto que consiste en la determinación de la respuesta inmune específica que el paciente desarrolla frente a la infección. Para el diagnóstico de coqueluche según la recomendación de la OMS, en menores de un año de edad es conveniente emplear el diagnóstico microbiológico y molecular. Para niños pueden emplearse el cultivo y la PCR y para adultos la metodología más útil



es la serología y en segundo lugar la PCR <sup>109</sup>. Asimismo, la serología resulta útil para estudios epidemiológicos <sup>42</sup>.

En la actualidad, existe un reconocimiento global de la necesidad de la armonización de las metodologías serológicas aplicadas al diagnóstico de coqueluche que permita establecer criterios para el diagnóstico de esta enfermedad. Estos métodos deben utilizarse en la conducción de estudios seroepidemiológicos que permitan conocer los patrones de la circulación de la enfermedad en la comunidad, como así también contribuir a evaluar la inmunogenicidad de las vacunas anti-pertussis <sup>99</sup>.

Se reconoce que la toxina pertussis es el único antígeno específico de *B. pertussis*. Las recomendaciones internacionales establecen el empleo del ELISA para la titulación de anticuerpos IgG antitoxina pertussis (PTx) en una única muestra de suero. Pueden emplearse muestras de sueros pareados, pero en este caso se presenta la dificultad de la obtención de la segunda muestra de suero. Es necesario disponer de PTx purificada, no detoxificada. Los resultados deben expresarse en Unidades Internacionales/ml (IU/ml), y deben emplearse los testigos calibrados contra el patrón internacional actualmente disponible, es decir el "World Health Organization Reference Reagent (06/142)" <sup>112</sup>. Finalmente, es de fundamental importancia, establecer los resultados basándose en un simple o doble punto de corte poblacional comprendido entre 50-120 IU/ml. Dicho punto de corte poblacional es dependiente del esquema de vacunación empleado en cada comunidad y por ello debe ser establecido en cada población <sup>50, 109</sup>. Según la literatura se reportan diferentes puntos de corte poblacionales, por ejemplo en Massachusetts se reportó un punto de corte de 100 IU/ml<sup>71</sup> y luego, a fin de aumentar la especificidad, se cambió por un punto de corte de 200 IU/ml <sup>113</sup>. Los Centros para el Control y

Prevención de las Enfermedades de los EE.UU. (CDC) estimaron como punto de corte poblacional el valor  $\geq 94$  IU/ml<sup>10</sup>, en los Países Bajos se emplea un punto de corte de 125 IU/ml<sup>26</sup>, en Alemania, un estudio arrojó como punto de corte poblacional el valor de 40 IU/ml<sup>111</sup>, etc. Hasta el momento ningún país latinoamericano o con esquema de vacunación similar al nuestro, ha realizado un estudio para la estimación de dicho punto de corte poblacional.

El ensayo de ELISA para anticuerpos IgG anti PTx debe utilizarse para aquellas personas que hayan recibido la última dosis de vacuna celular tres años antes del momento de la toma de muestra<sup>109</sup> o, si se trata de vacunas acelulares, un año antes de recibir la última dosis<sup>10</sup>. La muestra debe ser recolectada cuando hayan transcurrido 14 días o más de tos. La serología presenta mayor sensibilidad durante la fase paroxística y la fase de convalecencia de la enfermedad<sup>100</sup>.

En la actualidad, las técnicas de fijación del complemento, la microaglutinación y la inmunofluorescencia indirecta, no son recomendables debido a su baja sensibilidad y especificidad<sup>32</sup>.

La determinación de IgM dirigida contra uno o varios determinantes antigénicos de *B. pertussis*, no tiene valor diagnóstico. La medición de los niveles de anticuerpos de tipo IgM mostró baja sensibilidad en comparación con los dosajes de IgG e inclusive de IgA<sup>46</sup>. La baja sensibilidad observada para el dosaje de IgM puede deberse a que es habitual que hayan transcurrido varios días cuando los adultos consultan al médico por presentar un cuadro de tos prolongada; en este momento los niveles de IgM pueden estar disminuyendo al mismo tiempo que están aumentando los niveles de IgG y de IgA. Por otro lado hay que destacar que cuando personas vacunadas se infectan con *B. pertussis*, se desencadena una respuesta

inmune de tipo secundaria, en la cual predominan los anticuerpos de tipo IgG e IgA

59

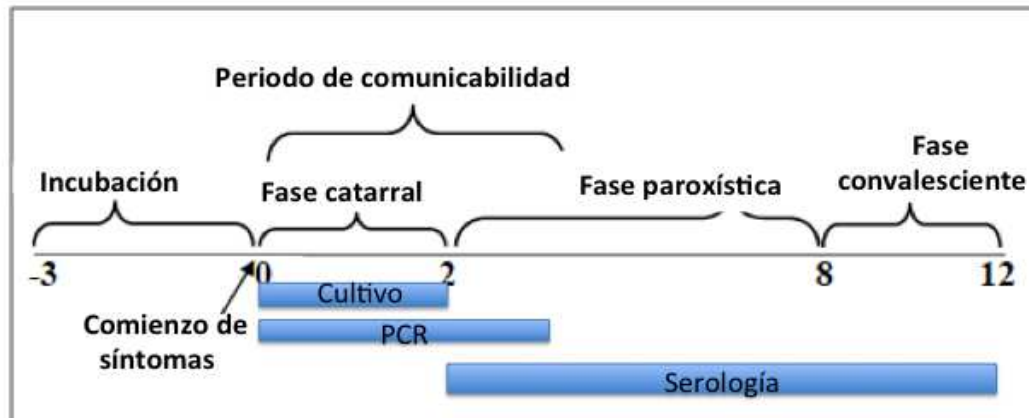
### **Interpretación e importancia de los resultados del laboratorio**

Los resultados del laboratorio no deben interpretarse de manera aislada sino en el marco del conocimiento los datos clínicos y epidemiológicos del paciente y de la enfermedad. Así por ejemplo un resultado negativo puede darse aún en pacientes que están infectados con *Bordetella*. Los resultados del laboratorio dependen, entre otros, del momento de la enfermedad en que se toma la muestra (en la figura 5 se indican las muestras recomendadas para cada período de la enfermedad), de la edad de los pacientes, del estado inmune de los mismos y del tratamiento con antimicrobianos. Los resultados del laboratorio por sí solos no confirman ni descartan un caso de coqueluche.

El cultivo de *Bordetella* es la prueba diagnóstica más específica. Todos los pacientes con tos y un cultivo positivo *B. pertussis* deben ser reportados como confirmados, incluso aquellos con tos que dura menos de 14 días.

El diagnóstico microbiológico resulta fundamental para diferenciar la presencia de otros patógenos que pueden ocasionar síntomas similares, para confirmar un brote y para estudiar la divergencia y evolución bacteriana. Por su parte el diagnóstico molecular es la herramienta de elección para hacer más oportunas las acciones. Los casos que cumplen la definición clínica de caso con un resultado de PCR positivo son clasificados como caso confirmado. La serología resulta importante en los estudios epidemiológicos y como metodología diagnóstica para la población adolescente adulta.

Para confirmar un caso por nexo epidemiológico, el caso clínico debe estar directamente vinculado a un caso confirmado por laboratorio.



**Figura 5:** Tiempo óptimo para la toma de la muestra

## Sensibilidad a los antibióticos

Los antibióticos de elección para el tratamiento de pertussis son los macrólidos <sup>19, 98</sup>. Existen distintas recomendaciones según la edad del paciente para el uso de eritromicina, claritromicina o azitromicina (Tabla 7). Para aquellos casos que presentan intolerancia al tratamiento con macrólidos o, mucho menos frecuentemente, resistencia a este tratamiento, está recomendado el uso de trimetoprima-sulfametoxazol <sup>82</sup>.

La terapia antimicrobiana con macrólidos puede moderar el curso clínico de la enfermedad cuando se administra durante el período de incubación o en la fase catarral temprana y así acortar el período de transmisibilidad <sup>12</sup>. Si se administra

durante la fase paroxística disminuye el período de transmisibilidad, pero no altera el curso clínico de la enfermedad <sup>3</sup>.

Los contactos sintomáticos de un caso de coqueluche deben recibir el mismo esquema antimicrobiano que los casos, mientras que los contactos no sintomáticos pueden recibir quimioprofilaxis posexposición para prevenir casos secundarios <sup>98</sup>.

Se han encontrado algunos aislamientos de *B. pertussis* que presentan resistencia a los macrólidos en los Estados Unidos <sup>8</sup>, Francia<sup>49</sup> y recientemente en China. El mecanismo de resistencia detectado en estos casos parece deberse a una mutación que afecta el sitio de unión entre el ribosoma y el macrólido. No se descarta que puedan existir otros mecanismos de resistencia aún no detectados. Esto resalta la necesidad de estudiar la sensibilidad a los macrólidos de los aislamientos clínicos, sobre todo en los casos donde se observan fallas de tratamiento y especialmente en menores de 6 meses de edad <sup>49</sup>.

El estudio de sensibilidad a los antimicrobianos no está estandarizado para las especies de *Bordetella*.

*B. holmesii* mostró sensibilidad in vitro a piperacilina, ceftacídima, meropenem, ciprofloxacina y trimetoprima-sulfametoxazol <sup>79</sup>. Por otro lado *B. bronchiseptica* y *B. avium* mostraron sensibilidad in vitro a piperacilina, gentamicina, amicacina, y cefoperazona; además mostraron resistencia a penicilina y cefuroxima <sup>74</sup>. El tratamiento con amoxicilina-ácido clavulánico en pacientes infectados con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y diagnosticados con neumonía causada por *B. bronchiseptica* mostró efectividad clínica <sup>101</sup>.

Dado que el conocimiento es hasta ahora escaso, se recomienda profundizar los estudios de sensibilidad antimicrobiana para estos patógenos.

**Tabla 7.** Tratamiento antimicrobiano recomendado para pertussis y profilaxis posexposición, según grupo etario.

Grupo etario	Agentes primarios			Agente Alternativo*
	Azitromicina	Eritromicina	Claritromicina	Trimetoprima-sulfametoxazol (TMP-SXT)
<1 mes	Agente recomendado. 10 mg/kg por día en una única dosis, durante 5 días	No es el agente de elección. Está asociada a estenosis pilórico-hipertrofica infantil. Usar si azitromicina no está disponible. 40-50 mg/kg por día, dividido en 4 dosis, durante 14 días	Agente no recomendado.	Contraindicado en niños <2 meses (riesgo de kénicterus)
1-5 meses	10 mg/kg por día en una única dosis, durante 5 días.	40–50 mg/kg por día, dividido en 4 dosis, durante 14 días	15 mg/kg por día, dividido en 2 dosis, durante 7 días	Contraindicado en niños <2 meses. Para chicos >2 meses, TMP 8 mg/kg por día, SXT 40 mg/kg por día, dividido en 2 dosis, durante 14 días
Niños >6 meses	10 mg/kg en una única dosis en el primer día, luego 5 mg/kg por día (máximo: 500 mg) en los días 2 a 5	40–50 mg/kg por día (máximo: 2 g por día), dividido en 4 dosis, durante 14 días	15 mg/kg por día dividido en 2 dosis (máximo: 1 g por día) durante 7 días	TMP 8 mg/kg por día, SXT 40 mg/kg por día, dividido en 2 dosis, durante 14 días
Adultos	500 mg en una única dosis en el primer día, luego 250 mg por día en los días 2 a 5.	2 g por día, dividido en 4 dosis, durante 14 días	1 g por día, dividido en 2 dosis, durante 7 días	TMP 320 mg por día, SXT 1600 mg por día, dividido en 2 dosis, durante 14 días

Modificada de CDC. Recommended antimicrobial agents for treatment and postexposure prophylaxis of pertussis - 2005 Guidelines CDC. MMWR. 2005; 54:3.

## Bibliografía

1. Abramson T, Kedem H, Relman DA. Modulation of the NF-kappaB pathway by *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. PLoS One. 2008; 3:e3825.
2. Altschul SF. Evolutionary trees for the genus *Bordetella*. J Bacteriol. 2008; 171:1211-3.

3. Altunajji S, Kukuruzovic R, Curtis N, Massie J. Antibiotics for whooping cough (pertussis). Cochrane database of systematic reviews. 2005; 1:CD004404
4. Andreesco V, Caffè I, Barber GC, Pozsgì N, David C. Research on the biological properties of some extracts of *B. pertussis*, *B. parapertussis* and *B. bronchiseptica*. Arch Roum Pathol Exp Microbiol. 1965; 24:945-58.
5. Arico B, Gross R, Smida J, Rappuoli R. Evolutionary relationships in the genus *Bordetella*. Mol Microbiol. 1987; 1:301-8.
6. Arvand M, Feldhues R, Mieth M, Kraus T, Vandamme P. Chronic cholangitis caused by *Bordetella hinzii* in a liver transplant recipient. J Clin Microbiol. 2004; 42: 2335-7.
7. Bart MJ, Harris SR, Advani A, Arakawa Y, Bottero D, Bouchez V, Cassiday PK, Chiang CS, Dalby T, Fry NK, Gaillard ME, van Gent M, Guiso N, Hallander HO, Harvill ET, He Q, van der Heide HG, Heuvelman K, Hozbor DF, Kamachi K, Karataev GI, Lan R, Lutyńska A, Maharjan RP, Mertsola J, Miyamura T, Octavia S, Preston A, Quail MA, Sintchenko V, Stefanelli P, Tondella ML, Tsang RS, Xu Y, Yao SM, Zhang S, Parkhill J, Mooi FR. Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination. MBio. 2014;5:e01074.
8. Bartkus JM, Juni BA, Ehresmann K, Miller CA, Sanden GN, Cassiday PK, Saubolle M, Lee B, Long J, Harrison AR Jr, Besser JM. Identification of a mutation associated with erythromycin resistance in *Bordetella pertussis*: implications for surveillance of antimicrobial resistance. J Clin Microbiol. 2003; 41:1167-72.
9. Batey RG, Smits AF. The isolation of *Bordetella bronchiseptica* from an outbreak of canine pneumonia. Aust Vet J. 1976; 52:184-6.
10. Baughman AL, Bisgard KM, Edwards KM, Guris D, Decker MD, Holland K, Meade BD, Lynn F. Establishment of diagnostic cutoff points for levels of serum antibodies to pertussis toxin, filamentous hemagglutinin, and fimbriae in adolescents and adults in the United States. Clin Diagn Lab Immunol. 2004; 11:1045-53.
11. Bordet JG. Le microbe de la coqueluche. Ann Inst Pasteur. 1906; 20:731-41.
12. Bortolussi R, Miller B, Ledwith M, Halperin S. Clinical course of pertussis in immunized children. Pediatr Infect Dis J. 1995; 14:870-4.

13. Bottero D, Gaillard ME, Basile LA, Fritz M, Hozbor DF. Genotypic and phenotypic characterization of *Bordetella pertussis* strains used in different vaccine formulations in Latin America. *J Appl Microbiol.* 2012; 112:1266-76.
14. Bottero D, Gaillard ME, Fingerhann M, Weltman G, Fernandez J, Sisti F, Graieb A, Roberts R, Rico O, Ríos G, Regueira M, Binsztein N, Hozbor D. Pulsed-field gel electrophoresis, pertactin, pertussis toxin S1 subunit polymorphisms, and surfaceome analysis of vaccine and clinical *Bordetella pertussis* strains. *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14:1490-8.
15. Bottero D, Griffith MM, Lara C, Flores D, Pianciola L, Gaillard ME, Mazzeo M, Zamboni MI, Spoletti MJ, Anchart E, Ruggeri D, Sorhouet C, Fiori S, Galas M, Tondella ML, Hozbor DF. *Bordetella holmesii* in children suspected of pertussis in Argentina. *Epidemiol Infect.* 2013; 141:714-7.
16. Buboltz AM, Nicholson TL, Weyrich LS, Harvill ET. Role of the type III secretion system in a hypervirulent lineage of *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun.* 2009; 77:3969-77.
17. CDC. Pertussis epidemic--Washington. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2012; 61:517-22.
18. Cherry JD, Seaton BL. Patterns of *Bordetella parapertussis* respiratory illnesses: 2008-2010. *Clin Infect Dis.* 2012; 54:534-7.
19. Chodorowska M, Kuklinska D, Tyski S. Susceptibility to macrolide antibiotics of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* strains isolated from whooping cough patients in 1968 and in 1997-99. *Med Dosw Mikrobiol.* 2001; 53:39-43.
20. Clark TA. Changing pertussis epidemiology: everything old is new again. *J Infect Dis.* 2014; 209:978-81.
21. Coenye T, Goris J, Spilker T, Vandamme P, LiPuma JJ. Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:2062-9.
22. Cookson BT, Vandamme P, Carlson LC, Larson AM, Sheffield JV, Kersters K, Spach DH. Bacteremia caused by a novel *Bordetella* species, "*B. hinzi*". *J Clin Microbiol.* 1994; 32:2569-71.
23. Cotter PA, Jones AM. Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol.* 2003; 11:367-73.
24. Cotter PA, Miller JF. Genetic analysis of the *Bordetella* infectious cycle. *Immunopharmacology.* 2000; 48:253-5.



25. Cullinane LC, Alley MR, Marshall RB, Manktelow BW. *Bordetella parapertussis* from lambs. N Z Vet J. 1987; 35:175.
26. de Melker HE, Versteegh FG, Conyn-Van Spaendonck MA, Elvers LH, Berbers GA, et al. Specificity and sensitivity of high levels of immunoglobulin G antibodies against pertussis toxin in a single serum sample for diagnosis of infection with *Bordetella pertussis*. J Clin Microbiol. 2000; 38:800-6.
27. Diavatopoulos DA, Cummings CA, Schouls LM, Brinig MM, Relman DA, Mooi FR. *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of *B. bronchiseptica*. PLoS Pathog. 2005; 1:e45.
28. Diavatopoulos DA, Cummings CA, van der Heide HG, van Gent M, Liew S, Relman DA, Mooi FR. Characterization of a highly conserved island in the otherwise divergent *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis* genomes. J Bacteriol. 2006; 188:8385-94.
29. Edwards KM. Overview of pertussis: focus on epidemiology, sources of infection, and long term protection after infant vaccination. Pediatr Infect Dis J. 2005; 24:S104-8.
30. Eldering G, Kendrick P. *Bacillus parapertussis*: a species resembling both *Bacillus pertussis* and *Bacillus bronchisepticus* but identical with neither. J Bacteriol. 1937; 35:561-72.
31. Falleiros Arlant LH, de Colsa A, Flores D, Brea J, Avila Agüero ML, Hozbor DF. Pertussis in Latin America: epidemiology and control strategies. Expert Rev Anti Infect Ther. 2014; 12:1265-75.
32. Finger H, Wirsing von Koenig CH. Serological diagnosis of whooping cough. Dev Biol Stand. 1985; 61:331-5.
33. Fingermann M, Fernández J, Sisti F, Rodríguez ME, Gatti B, Bottero D, Graieb A, Gaillard ME, Ayala SG, Mooi FR, Lopardo H, Hozbor D. Differences of circulating *Bordetella pertussis* population in Argentina from the strain used in vaccine production. Vaccine. 2006; 24:3513-21.
34. Fry NK, Duncan J, Malnick H, Cockcroft PM. The first UK isolate of '*Bordetella ansorpii*' from an immunocompromised patient. J Med Microbiol. 2007; 56:993-5.
35. Fry NK, Duncan J, Malnick H, Warner M, Smith AJ, Jackson MS, Ayoub A. *Bordetella petrii* clinical isolate. Emerg Infect Dis. 2005; 11:1131-3.
36. Fry NK, Duncan J, Wagner K, Tzivra O, Doshi N, Litt DJ, Crowcroft N, Miller E, George RC, Harrison TG. Role of PCR in the diagnosis of pertussis infection in infants: 5 years' experience of provision of a same-day real-time PCR service in England and Wales from 2002 to 2007. J Med Microbiol. 2009; 58:1023-9.

37. Fry NK, Tzivra O, Li YT, McNiff A, Doshi N, Maple PA, Crowcroft NS, Miller E, George RC, Harrison TG. Laboratory diagnosis of pertussis infections: the role of PCR and serology. *J Med Microbiol.* 2004; 53:519-25.
38. Funke G, Hess T, von Graevenitz A, Vandamme P. Characteristics of *Bordetella hinzii* strains isolated from a cystic fibrosis patient over a 3-year period. *J Clin Microbiol.* 1996; 34:966-9.
39. Gaillard ME, Bottero D, Castuma CE, Basile LA, Hozbor D. Laboratory adaptation of *Bordetella pertussis* is associated with the loss of type three secretion system functionality. *Infect Immun.* 2011; 79:3677-82.
40. Gallagher GL. Isolation of *Bordetella bronchiseptica* from horses. *Vet Rec.* 1965; 77:632-3.
41. Gerlach G, von Wintzingerode F, Middendorf B, Gross R. Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. *Microbes Infect.* 2001; 3:61-72.
42. Giammanco A, Chiarini A, Maple PA, Andrews N, Pebody R, Gay N, Olander RM, Fivet-Groyne F, Baron S, Tischer A, Swidsinski S, Schellekens J, Reizenstein E. European Sero-Epidemiology Network: standardisation of the assay results for pertussis. *Vaccine.* 2003; 22:112-20.
43. Gilberg S, Njamkepo E, Du Chatelet IP, Partouche H, Gueirard P, Ghasarossian C, Schlumberger M, Guiso N. Evidence of *Bordetella pertussis* infection in adults presenting with persistent cough in a French area with very high whole-cell vaccine coverage. *J Infect Dis.* 2002; 186:415-8.
44. Glare EM, Paton JC, Premier RR, Lawrence AJ, Nisbet IT. Analysis of a repetitive DNA sequence from *Bordetella pertussis* and its application to the diagnosis of pertussis using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1990; 28:1982-7.
45. Goodnow RA. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol Rev.* 1980; 44:722-38.
46. Granstrom G, Wretling B, Salenstedt CR, Granstrom M. Evaluation of serologic assays for diagnosis of whooping cough. *J Clin Microbiol.* 1988; 26:1818-23.
47. Grimpel E. Pertussis. Diagnosis, prevention. *Rev Prat.* 1997; 47:423-6.
48. Guetter SD, Eiteman MA. Production of biomass and filamentous hemagglutinin by *Bordetella bronchiseptica*. *Bioprocess Biosys Eng.* 2014; 37:115-23.
49. Guillot S, Descours G, Gillet Y, Etienne J, Floret D, Guiso N. Macrolide-resistant *Bordetella pertussis* infection in newborn girl, France. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18:966-8.

50. Guiso N, Berbers G, Fry NK, He Q, Riffelmann M, Wirsing von Konig CH. What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011; 30:307-12.
51. Harrington AT, Castellanos JA, Ziedalski TM, Clarridge JE, 3rd, Cookson BT. Isolation of *Bordetella avium* and novel *Bordetella* strain from patients with respiratory disease. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15:72-4.
52. Hoorfar J, Malorny B, Abdulmawjood A, Cook N, Wagner M, Fach P. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *J Clin Microbiol*. 2004; 42:1863-8.
53. Hoppe JE, Schlagenhauf M. Comparison of three kinds of blood and two incubation atmospheres for cultivation of *Bordetella pertussis* on charcoal agar. *J Clin Microbiol*. 1989; 27:2115-7.
54. Hozbor D, Mooi F, Flores D, Weltman G, Bottero D, Fossati S, Lara C, Gaillard ME, Pianciola L, Zurita E, Fioriti A, Archuby D, Galas M, Binsztein N, Regueira M, Castuma C, Fingermann M, Graieb A. Pertussis epidemiology in Argentina: trends over 2004-2007. *J Infect*. 2009; 59:225-31.
55. Inatsuka CS, Julio SM, Cotter PA. *Bordetella* filamentous hemagglutinin plays a critical role in immunomodulation, suggesting a mechanism for host specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102:18578-83.
56. Jones AM, Boucher PE, Williams CL, Stibitz S, Cotter PA. Role of BvgA phosphorylation and DNA binding affinity in control of Bvg-mediated phenotypic phase transition in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol*. 2005; 58:700-13.
57. Kattar MM, Chavez JF, Limaye AP, Rassoulilian-Barrett SL, Yarfitz SL, Carlson LC, Houze Y, Swanzy S, Wood BL, Cookson BT. Application of 16S rRNA gene sequencing to identify *Bordetella hinzii* as the causative agent of fatal septicemia. *J Clin Microbiol*. 2000; 38:789-94.
58. Kersters K HK, Hertle A, Segers P, Lievens A, Siegmann O, De Ley J. *Bordetella avium* sp. nov., isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds. *Int J Syst Bacteriol*. 1984; 34:56-70.
59. Klement E, Kagan N, Hagain L, Kayouf R, Boxman J, Cohen D, Orr N. Correlation of IgA, IgM and IgG antibody-detecting assays based on filamentous haemagglutinin, pertussis toxin and *Bordetella pertussis* sonicate in a strictly adult population. *Epidemiol Infect*. 2005; 133:149-58.
60. Ko KS, Peck KR, Oh WS, Lee NY, Lee JH, Song JH. New species of *Bordetella*, *Bordetella ansorpilii* sp. nov., isolated from the purulent exudate of an epidermal cyst. *J Clin Microbiol*. 2005; 43:2516-9.

61. Koepke R, Eickhoff JC, Ayele RA, Petit AB, Schauer SL, Hopfensperger DJ, Conway JH, Davis JP. Estimating the effectiveness of Tdap vaccine for preventing pertussis: evidence of rapidly waning immunity and differences in effectiveness by Tdap brand. *J Infect Dis.* 2014; 210:942-53.
62. Koidl C, Bozic M, Burmeister A, Hess M, Marth E, Kessler HH. Detection and differentiation of *Bordetella* spp. by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:347-50.
63. Kozak NA, Mattoo S, Foreman-Wykert AK, Whitelegge JP, Miller JF. Interactions between partner switcher orthologs BtrW and BtrV regulate type III secretion in *Bordetella*. *J Bacteriol.* 2005; 187:5665-76.
64. Lam C, Octavia S, Ricafort L, Sintchenko V, Gilbert GL, Wood N, McIntyre P, Marshall H, Guiso N, Keil AD, Lawrence A, Robson J, Hogg G, Lan R. Rapid Increase in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Australia. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20:626-33.
65. Libster R, Edwards KM. Re-emergence of pertussis: what are the solutions? *Expert Rev Vaccines.* 2012; 11:1331-46.
66. Lievano FA, Reynolds MA, Waring AL, Ackelsberg J, Bisgard KM, Sanden GN, Guris D, Golaz A, Bopp DJ, Limberger RJ, Smith PF. Issues associated with and recommendations for using PCR to detect outbreaks of pertussis. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:2801-5.
67. Lindquist SW, Weber DJ, Mangum ME, Hollis DG, Jordan J. *Bordetella holmesii* sepsis in an asplenic adolescent. *Pediatr Infect Dis J.* 1995; 14:813-5.
68. Loeffelholz M. Towards improved accuracy of *Bordetella pertussis* nucleic acid amplification tests. *J Clin Microbiol.* 2012; 50:2186-90.
69. Loeffelholz MJ, Thompson CJ, Long KS, Gilchrist MJ. Detection of *Bordetella holmesii* using *Bordetella pertussis* IS481 PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:467.
70. Mandal S, Tatti KM, Woods-Stout D, Cassidy PK, Faulkner AE, Griffith MM, Jackson ML, Pawloski LC, Wagner B, Barnes M, Cohn AC, Gershman KA, Messonnier NE, Clark TA, Tondella ML, Martin SW. Pertussis pseudo-outbreak linked to specimens contaminated by *Bordetella pertussis* DNA From clinic surfaces. *Pediatrics.* 2012; 129:e424-30.
71. Marchant CD, Loughlin AM, Lett SM, Todd CW, Wetterlow LH, Bicchieri R, Higham S, Etkind P, Silva E, Siber GR. Pertussis in Massachusetts, 1981-1991: incidence, serologic diagnosis, and vaccine effectiveness. *J Infect Dis.* 1994; 169:1297-305.

72. Mooi FR. *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect Genet Evol.* 2009; 10:36-49.
73. Mooi FR, van Loo IH, van Gent M, He Q, Bart MJ, Heuvelman KJ, de Greeff SC, Diavatopoulos D, Teunis P, Nagelkerke N, Mertsola J. *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15:1206-13.
74. Mortensen JE, Brumbach A, Shryock TR. Antimicrobial susceptibility of *Bordetella avium* and *Bordetella bronchiseptica* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33:771-2.
75. Musser JM, Hewlett EL, Peppler MS, Selander RK. Genetic diversity and relationships in populations of *Bordetella* spp. *J Bacteriol.* 1986; 166:230-7.
76. Muyldermans G, Soetens O, Antoine M, Bruisten S, Vincart B, Doucet-Populaire F, Fry NK, Olcén P, Scheffel JM, Senterre JM, van der Zee A, Riffelmann M, Piérard D, Lauwers S. External quality assessment for molecular detection of *Bordetella pertussis* in European laboratories. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:30-5.
77. Njamkepo E, Bonacorsi S, Debryne M, Gibaud SA, Guillot S, Guiso N. Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. *J Clin Microbiol.* 2011; 49:4347-8.
78. Nygren M, Reizenstein E, Ronaghi M, Lundeberg J. Polymorphism in the pertussis toxin promoter region affecting the DNA-based diagnosis of *Bordetella* infection. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:55-60.
79. Panagopoulos MI, Saint Jean M, Brun D, Guiso N, Bekal S, Ovetchkine P, Tapiero B. *Bordetella holmesii* bacteremia in asplenic children: report of four cases initially misidentified as *Acinetobacter lwoffii*. *J Clin Microbiol.* 2010; 48:3762-4.
80. Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, Holden MT, Churcher CM, Bentley SD, Mungall KL, Cerdeño-Tárraga AM, Temple L, James K, Harris B, Quail MA, Achtman M, Atkin R, Baker S, Basham D, Bason N, Cherevach I, Chillingworth T, Collins M, Cronin A, Davis P, Doggett J, Feltwell T, Goble A, Hamlin N, Hauser H, Holroyd S, Jagels K, Leather S, Moule S, Norberczak H, O'Neil S, Ormond D, Price C, Rabinowitsch E, Rutter S, Sanders M, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Unwin L, Whitehead S, Barrell BG, Maskell DJ.. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet.* 2003; 35:32-40.

81. Pawloski LC, Queenan AM, Cassiday PK, Lynch AS, Harrison MJ, Shang W, Williams MM, Bowden KE, Burgos-Rivera B, Qin X, Messonnier N, Tondella ML. Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in the United States. *Clin Vaccine Immunol*. 2014; 21:119-25.
82. Pediatrics Ao. 2003. Report of the Committee on Infectious Diseases. En: Pickering LK, Baker CJ, Overturf, GD, Prober CG, editors. Red Book 2003, 26<sup>th</sup> edition. Elk Grove Village (IL), The American Academy of Pediatrics, 2003, p. 472-86.
83. Pianciola L, Mazzeo M, Flores D, Hozbor D. Optimización del procesamiento y la conservación de muestras clínicas destinadas al diagnóstico molecular de coqueluche. *Rev Argent Microbiol*. 2010; 42:108-13.
84. Porter JF, Connor K, van der Zee A, Reubsæet F, Ibsen P, Heron I, Chaby R, Le Blay K, Donachie W.. Characterisation of ovine *Bordetella parapertussis* isolates by analysis of specific endotoxin (lipopolysaccharide) epitopes, filamentous haemagglutinin production, cellular fatty acid composition and antibiotic sensitivity. *FEMS Microbiol Lett*. 1995; 132:195-201.
85. Probert WS, Ely J, Schrader K, Atwell J, Nossoff A, Kwan S. Identification and evaluation of new target sequences for specific detection of *Bordetella pertussis* by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2008; 46:3228-31.
86. Qin X, Galanakis E, Martin ET, Englund JA. Multitarget PCR for diagnosis of pertussis and its clinical implications. *J Clin Microbiol*. 2007; 45:506-11.
87. Reischl U, Lehn N, Sanden GN, Loeffelholz MJ. Real-time PCR assay targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and molecular basis for detecting *Bordetella holmesii*. *J Clin Microbiol*. 2001; 39:1963-6.
88. Riffelmann M, Schmetz J, Bock S, Wirsing von Koenig CH. Preparation of *Bordetella pertussis* DNA from respiratory samples for real-time PCR by commercial kits. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008; 27:145-8.
89. Riffelmann M, Wirsing von Konig CH, Caro V, Guiso N. Nucleic Acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections. *J Clin Microbiol*. 2005; 43:4925-9.
90. Romanin V, Agostinho V, Califano G, Sagradini S, Aquino A, Juárez Mdel V, Antman J, Giovacchini C, Galas M, Lara C, Hozbor D, Gentile A, Vizzotti C. Epidemiological situation of pertussis and strategies to control it: Argentina, 2002-2011. *Arch Argent Pediatr*. 2014; 112:413-20.

91. Ross PJ, Sutton CE, Higgins S, Allen AC, Walsh K, Misiak A, Lavelle EC, McLoughlin RM, Mills KH. Relative contribution of Th1 and Th17 cells in adaptive immunity to *Bordetella pertussis*: towards the rational design of an improved acellular pertussis vaccine. PLoS Pathog. 2013; 9:e1003264.
92. Russell FM, Davis JM, Whipp MJ, Janssen PH, Ward PB, Vyas JR, Starr M, Sawyer SM, Curtis N. Severe *Bordetella holmesii* infection in a previously healthy adolescent confirmed by gene sequence analysis. Clin Infect Dis. 2001; 33:129-30.
93. Shepard CW, Daneshvar MI, Kaiser RM, Ashford DA, Lonsway D, Patel JB, Morey RE, Jordan JG, Weyant RS, Fischer M. *Bordetella holmesii* bacteremia: a newly recognized clinical entity among asplenic patients. Clin Infect Dis. 2004; 38:799-804.
94. Tatti KM, Sparks KN, Boney KO, Tondella ML. Novel multitarget real-time PCR assay for rapid detection of *Bordetella* species in clinical specimens. J Clin Microbiol. 2011; 49:4059-66.
95. Tatti KM, Wu KH, Tondella ML, Cassidy PK, Cortese MM, Wilkins PP, Sanden GN. Development and evaluation of dual-target real-time polymerase chain reaction assays to detect *Bordetella* spp. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008; 61:264-72.
96. Tazato N, Handa Y, Nishijima M, Kigawa R, Sano C, Sugiyama J. Three novel environmental *Bordetella* species isolated from the plaster wall surface of mural paintings in the Takamatsuzuka Tumulus, Nara, Japan: *Bordetella muralis* sp. nov., *Bordetella tumulicola* sp. nov. and *Bordetella tumbae* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2015; doi: 10.1099/ijsem.0.000655.
97. Tejpratap T, Murphy TV, Moran J. Recommended antimicrobial agents for the treatment and postexposure prophylaxis of pertussis - 2005 CDC Guidelines. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2005; 54:1-16.
98. Tiwari T, Murphy TV, Moran J. Recommended antimicrobial agents for the treatment and postexposure prophylaxis of pertussis: 2005 CDC Guidelines. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2005; 54:1-16.
99. Tondella ML, Carlone GM, Messonnier N, Quinn CP, Meade BD, Burns DL, Cherry JD, Guiso N, Hewlett EL, Edwards KM, Xing D, Giammanco A, Wirsing von König CH, Han L, Hueston L, Robbins JB, Powell M, Mink CM, Poolman JT, Hildreth SW, Lynn F, Morris A. International *Bordetella pertussis* assay standardization and harmonization meeting report. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, United States, 19-20 July 2007. Vaccine. 2009; 27:803-14.

100. Tozzi AE, Celentano LP, Ciofi degli Atti ML, Salmaso S. Diagnosis and management of pertussis. *CMAJ*. 2005; 172:509-15.
101. Valencia ME, Enriquez A, Camino N, Moreno V. Neumonía por *Bordetella bronchiseptica* en pacientes con infección por el VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004; 22:502-3.
102. van den Akker WM. The filamentous hemagglutinin of *Bordetella parapertussis* is the major adhesin in the phase-dependent interaction with NCI-H292 human lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 252:128-33.
103. van der Zee A, Agterberg C, van Agterveld M, Peeters M, Mooi FR. Characterization of *IS1001*, an insertion sequence element of *Bordetella parapertussis*. *J Bacteriol*. 1993; 175:141-7.
104. Vandamme P, Heyndrickx M, Vancanneyt M, Hoste B, De Vos P, Falsden E, Kersters K, Hinz KH. *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Ruger and Tan 1983. *Int J System Bacteriol*. 1996; 46:849-58.
105. von Wintzingerode F, Schattke A, Siddiqui RA, Rosick U, Gobel UB, Gross R. *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*. *Int J System Evol Microbiol*. 2001; 51:1257-65.
106. Warfel JM, Zimmerman LI, Merkel TJ. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111:787-92.
107. Weiss AA, Melton AR, Walker KE, Andraos-Selim C, Meidl JJ. Use of the promoter fusion transposon Tn5 lac to identify mutations in *Bordetella pertussis* vir-regulated genes. *Infect Immun*. 1989; 57:2674-82.
108. Weyant RS, Hollis DG, Weaver RE, Amin MF, Steigerwalt AG, O'Connor SP, Whitney AM, Daneshvar MI, Moss CW, Brenner DJ.. *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. *J Clin Microbiol*. 1995; 33:1-7.
109. WHO. Laboratory manual for the diagnosis of whooping cough cused by *Bordetella pertussis* / *Bordetella parapertussis*. *Inmunization, Vaccines and Biologicals*. 04.14:54, 2004.
110. WHO. Pertussis vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*. 2010; 85:385-400.
111. Wirsing von Konig CH, Gounis D, Laukamp S, Bogaerts H, Schmitt HJ. Evaluation of a single-sample serological technique for diagnosing pertussis in unvaccinated children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1999; 18:341-5.



112. Xing D, Wirsing von Konig CH, Newland P, Riffelmann M, Meade BD, Corbel M, Gaines-Das R. Characterization of reference materials for human antiserum to pertussis antigens by an international collaborative study. *Clin Vaccine Immunol*. 2009; 16:303-11.
113. Yih WK, Lett SM, des Vignes FN, Garrison KM, Sipe PL, Marchant CD. The increasing incidence of pertussis in Massachusetts adolescents and adults, 1989-1998. *J Infect Dis*. 2000; 182:1409-16.
114. Yih WK, Silva EA, Ida J, Harrington N, Lett SM, George H. 1999. *Bordetella holmesii*-like organisms isolated from Massachusetts patients with pertussis-like symptoms. *Emerg Infect Dis*. 1999; 5:441-3.

## **Capítulo II.c.4.4**

### **Género *Brucella***

**NIDIA E. LUCERO**

Servicio de Brucelosis, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS

“Dr. Carlos G. Malbrán”, Ciudad Autónoma de Buenos Aires

**MARTA A. ALMIRON**

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de San Martín-

CONICET, San Martín, Provincia de Buenos Aires

**SILVIO L. CRAVERO**

Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INTA, Castelar,

Provincia de Buenos Aires

**MARCOS D. TRANGONI**

Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INTA, Castelar,

Provincia de Buenos Aires

## Introducción

La brucelosis también llamada fiebre de Malta, fiebre ondulante o del Mediterráneo es una enfermedad zoonótica, conocida desde fines del siglo XIX, que afecta a especies animales de sangre caliente. Es de difusión mundial y aunque ha sido erradicada en algunos países industrializados continúa siendo un problema difícil de resolver en países del área del Mediterráneo, del oeste de Asia, de África y de América Latina<sup>28, 46</sup>. En nuestra región se la conoce desde principios del siglo XX, se cree que fue introducida con los animales ingresados por los españoles durante la conquista, aunque es difícil precisar dónde apareció por primera vez. Algunos autores afirman que en 1898 fue diagnosticada en Venezuela, también ha sido asociada a una epidemia descrita como fiebre de larga duración, ocurrida en Perú entre 1906 y 1907<sup>39</sup>. Su persistencia se puede explicar por las particularidades geográficas de los países, la práctica de criar distintas especies de animales compartiendo pasturas y abrevaderos y la permanente interacción del medio rural con el urbano para adquirir insumos y comercializar productos. Los animales domésticos, en algunos lugares, son faenados sin control sanitario y sus múltiples derivados son manufacturados de manera artesanal, se expenden en la vecindad y en las rutas de acceso a las ciudades.

Los países de la región con mayor prevalencia son Argentina, México y Perú<sup>78</sup>. Los esfuerzos que realizan algunos países para controlar la infección en los animales suelen ser de baja efectividad por la epidemiología compleja de la brucelosis ya que no siempre se cuenta con recursos suficientes para asegurar la continuidad de los programas de control. En las últimas décadas, el aumento de las urbanizaciones y la explotación animal poco planificada favoreció su desarrollo. La

situación en la región y su impacto en la Salud Pública solo se conoce parcialmente, aunque podría disponerse de información certera mejorando los sistemas de información, estandarizando los métodos de diagnóstico y estimulando la cooperación entre los países.

## **Agente causal**

El término brucelosis se aplica a un grupo de enfermedades infecciosas estrechamente relacionadas, causadas por patógenos bacterianos gram negativos del género *Brucella*, llamado así en honor de David Bruce, quien en 1887 identificó *B. melitensis* como causa de la enfermedad de los militares británicos destinados a la isla de Malta. Sin embargo, Temístocles Zammit demostró en 1905 el carácter zoonótico de la brucelosis al comprobar que la fuente de infección era la leche de cabra que consumían los soldados. Bernhard Bang (Dinamarca) en 1897 aisló *B. abortus* de ganado bovino, Jacob Traum (EE.UU.) en 1914, *B. suis* de cerdos, Malcom Buddle (Nueva Zelanda) en 1956, *B. ovis* de ovejas, H. G. Stoener (EE.UU.) en 1957, *B. neotomae* de ratas del desierto de Utah y Leland Carmichael (EE.UU.) en 1968, *B. canis* de perros <sup>21, 27</sup>. En 1994 se describieron dos nuevas especies aisladas de mamíferos marinos <sup>25</sup>: *B. pinnipedialis* de focas y *B. ceti* de ballenas y delfines, que alertaron sobre la posible emergencia de otras especies que se podrían adaptar a los cambios sociales y a las modernas prácticas de producción de alimentos <sup>37</sup>. En 2008 fueron aceptadas *B. microti*, aislada del roedor *Microtus arvalis* <sup>94</sup> y *B. inopinata* aislada de un implante mamario (Tabla 1) <sup>29</sup>.

Actualmente se encuentra en estudio B.BO2, aislada de la biopsia de pulmón de un paciente con neumonía crónica<sup>101</sup>.

**Tabla 1:** Especies y biovariedades del género *Brucella* y sus principales hospederos  
28, 41, 74

Especies	biovar	Patogenicidad para el hombre	Hospedero preferido
<i>B. melitensis</i>	1, 2, 3	Alta	Cabras y ovejas
<i>B. abortus</i>	1-6, 9	Moderada	Bovinos
<i>B. suis</i>	1, 3	Alta	Cerdos
	2	SD	Liebres, cerdos
	4	Moderada	Renos
	5	Alta	Roedores
<i>B. ovis</i>		SD	Ovinos
<i>B. canis</i>		Baja	Perros
<i>B. neotomae</i>		SD	Ratas
<i>B. pinnipedialis</i>		Moderada	Focas
<i>B. ceti</i>		Moderada	Delfines, ballenas
<i>B. microti</i>		SD	Roedores
<i>B. inopinata</i>		SD	SD

SD: sin datos

## Aspectos taxonómicos

El género *Brucella* comparte la familia III *Brucellaceae*, junto a los géneros *Mycoplana* y *Ochrobactrum* del orden Riziohobiales, clase Alphaproteobacteria, phy-

*lum* Proteobacteria. Algunos miembros de la clase Alphaproteobacteria incluyen a microorganismos que son patógenos o que viven en simbiosis con mamíferos o plantas como los integrantes de los géneros *Bartonella*, *Rickettsia* y *Ehrlichia*, que afectan a mamíferos y se transmiten por vectores. En condiciones de temperatura y humedad adecuadas, *Brucella* puede sobrevivir en el suelo largos períodos de tiempo debido a su habilidad de metabolizar moléculas de origen vegetal<sup>70, 81</sup>. El aislamiento de *Brucella microti* del suelo sugiere un nicho ambiental compartido con los 3 géneros de la familia<sup>94</sup>. El tamaño del genoma del género *Brucella* indica que podría adaptarse a diferentes ambientes y hospederos. La habilidad para invadir células de mamíferos pudo haber sido adquirida en parte por ambos géneros, *Brucella* y *Bartonella*. Es posible que los genes comprometidos con la invasión de células de mamíferos estuvieran presentes en el microorganismo ancestral y se hayan perdido en los patógenos de las plantas. Los genomas de algunas especies del género *Brucella* presentan pseudogenes, indicando que durante la adaptación al estilo de vida intracelular se podría haber perdido la función de esos genes. La transferencia horizontal asociada con determinantes de virulencia estaría relacionada con la adaptación intracelular<sup>36</sup>. El genoma de *Brucella ovis*, considerada hasta ahora una especie no zoonótica, tiene inactivados algunos genes relacionados con la adquisición y utilización de nutrientes, con la estructura de la membrana celular y con la presencia de ureasa, que explicarían su limitación en el rango de hospederos. Se ha postulado una evolución conjunta de las especies de *Brucella* con sus hospederos, sin embargo esto no explicaría la limitada variación entre las especies del género y la gran variación observada en ellos. Usando un reloj molecular basado en el polimorfismo de un nucleótido en 13 diferentes genomas de las 6 especies clásicas del género, se ha demostrado que la mayoría de ellas

proceden de un ancestro común de 86.000-296.000 años <sup>13,38</sup>. Sin embargo, ese período fue anterior a la domesticación de los animales; es decir que las divergencias entre las especies de *Brucella* no coevolucionaron con los hospederos, sino que se adaptaron a sus preferencias <sup>13</sup>. No obstante, las especies pueden infectar en condiciones naturales o experimentales a animales que no son sus preferidos. Aunque esas infecciones se autolimitan, la transmisión puede ocurrir por contacto directo o por exposición.

Se ha pensado que el ancestro fue un organismo que evolucionó en un parásito animal pero ese proceso no se ha podido probar. Todos esos cambios pueden estar reflejados en el genoma por eso la importancia de la secuenciación. Hasta ahora los genomas secuenciados de distintas especies de *Brucella* muestran muy alta homología. En el genoma de *B. melitensis* 16M se ha identificado la presencia de dos cromosomas independientes que sugieren la modificación de un megaplásmido o la separación del cromosoma original en unidades separadas <sup>30</sup>. Esta organización genómica se ha observado también en géneros vecinos del subgrupo de las Alfabroteobacterias. Esta hipótesis se apoya en el hecho que *B. suis* biovar 3 tiene un solo cromosoma. Sin embargo, la caracterización de las funciones de replicación del plásmido y el origen de la replicación en el cromosoma II indicarían que el origen fue a partir de un plásmido. La presencia de un solo cromosoma en *B. suis* biovar 3 se explicaría mejor por una recombinación entre *loci* del rRNA. A pesar del origen plasmídico del cromosoma más pequeño, los genes esenciales se encuentran en ambos cromosomas y su distribución entre ambos es similar en las especies secuenciadas. El origen plasmídico del cromosoma II también se puede encontrar en los géneros relacionados en los cuales los plásmidos lineales y los megaplásmidos tienen igual localización genómica. Los genomas

comparten un contenido similar de CG, proporción similar de regiones de codificación y distribución equivalente de genes entre los cromosomas. La presencia de numerosos transposones, elementos de inserción y restos de fagos, son indicadores de la evolución. Se ha demostrado que *B. suis* tiene numerosas funciones metabólicas accesorias en el cromosoma II, incluyendo su capacidad para utilizar compuestos derivados de plantas. Esta es una característica conservada en las especies de *Brucella* y se relaciona con su capacidad para sobrevivir en el retículo endoplasmático del hospedero. A pesar de la adaptación específica al hospedero, las características relacionadas con la virulencia no parecen haber experimentado un cambio sustancial en el género. No se han podido demostrar algunos eventos mediados por fagos y de inserción/delección que podrían explicar las diferencias en la especificidad al hospedero y la virulencia.

Para identificar las especies y biovares del género, la taxonomía se ha basado en la caracterización fenotípica y en el hospedero del cual fueron aisladas las cepas, método que resultó de gran utilidad epidemiológica <sup>7</sup>. No obstante, hoy es difícil conciliar la tipificación tradicional con la amplia diversidad genética encontrada en estudios biomoleculares <sup>69</sup>. La primera evidencia molecular demostró que las especies y biovares eran indistinguibles y presentaban homologías de ADN superiores al 95%. En 1985 Verger y col.<sup>103</sup> realizaron estudios de hibridación de ADN y demostraron que *Brucella* es un género monoespecífico, sugiriendo simplificar la nomenclatura y llamarlo *Brucella melitensis*, compuesto por seis biovares (*melitensis*, *abortus*, *suis*, *canis*, *ovis* y *neotomae*). A pesar de la exactitud de la publicación, la nueva nomenclatura no fue bien recibida ya que la anterior había resultado beneficiosa para estudios epidemiológicos y la nueva propuesta daba lugar a confusiones. Además, este nuevo esquema de clasificación parecía



sobreestimar la importancia de la divergencia genética con respecto a la preferencia del hospedero y a la evolución. Por esta razón, en 2003, durante la reunión del Subcomité Internacional de Taxonomía y Nomenclatura del género *Brucella* del Comité Internacional de Sistemática de Procariotas (ICN-SCT genus *Brucella*) que tuvo lugar durante la Conferencia Internacional de Brucelosis en Pamplona, España, se acordó volver a la nomenclatura tradicional.

Con el advenimiento de la secuenciación genómica se comenzó a develar la naturaleza de la divergencia genética. Los estudios de VNTR (número variable de repeticiones en tándem, del inglés *Variable Number of Tandem Repeats*) demostraron que seis *loci* eran suficientes para determinar la designación de las especies y el análisis de un mayor número de *loci* permitiría discriminar el origen geográfico de las cepas y trazar el inicio de la infección <sup>108</sup>. Thomas Fitch <sup>36</sup>, sugirió que antes de aceptar una nueva especie se la debería tipificar aplicando técnicas tradicionales <sup>7</sup>, realizar un análisis de VNTR con no menos de 15 *loci*, secuenciar no menos de 9 *loci* y enviar los resultados a por lo menos dos miembros del Subcomité de Taxonomía.

## **Habitat y epidemiología**

Las especies de *Brucella* causan infecciones generalizadas en los animales con una fase bacteriémica seguida por localización. Generalmente se observa predilección por la placenta, las glándulas mamarias, los órganos sexuales, las articulaciones y las bolsas sinoviales. Su crecimiento *in vivo* es intracelular y puede ingresar y multiplicarse en una variedad de células incluyendo las epiteliales, trofoblastos de placenta, células dendríticas y macrófagos <sup>43</sup>. La enfermedad rara

vez es letal, aunque se puede localizar en diferentes órganos y producir una variedad de lesiones <sup>27</sup>. La transmisión sexual ocurre principalmente en cerdos, ovejas y perros. Puede cursar de manera subclínica, en esos casos el síntoma visible es el aborto mediante el cual se libera gran cantidad de microorganismos que contaminan el medio ambiente (pastizales, agua y/o tierra), aunque cuando el animal se encuentra infectado, el parto natural produce la misma contaminación. De esa forma se completa el ciclo infeccioso, al permitir el contagio de otros animales y la persistencia de la bacteria en la naturaleza. La transmisión puede ser por vía conjuntival, digestiva, respiratoria, genital o por contacto. Las mucosas, por ser barreras fácilmente franqueables, constituyen la principal puerta de entrada. Luego de la parición las vacas infectadas excretan *Brucella* en el calostro y en la leche hasta la tercera semana, aunque en presencia de mastitis intersticial la excreción es permanente. También se eliminan aunque en menor número por heces y orina. Todas las especies de *Brucella* pueden infectar a animales de experimentación como cobayos, ratones y conejos en los cuales la gravedad de la infección varía según la cepa inoculada <sup>50</sup>.

### **Situación en la Argentina**

En la Argentina la brucelosis bovina es conocida desde fines del siglo pasado. En 1966 se comenzó a desarrollar un programa de inmunización en algunas regiones y a partir de 1980 se hizo extensivo a todo el país. En 1993 el Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) creó la Comisión Nacional de Lucha contra Brucelosis y Tuberculosis que en 1996 elaboró un plan de control (Ley 24696). La primera etapa del Plan Nacional entró en vigencia en marzo de 1999 y en la

actualidad se ha logrado bajar la prevalencia al 2 - 6%. Las pérdidas económicas que produce se deben a la disminución en la producción de leche, muerte o pérdida de peso de los animales. La enfermedad limita las posibilidades de comercialización internacional del sector pecuario, afecta el consumo y la Salud Pública. Sobre la situación de la brucelosis en otras especies de animales, solo se dispone de datos parciales basados en estudios regionales. En ovinos se ha demostrado la existencia de epididimitis producida por *B. ovis* y, en perros, se ha comprobado la infección por *B. canis*<sup>91</sup>. Se estima que la prevalencia de la brucelosis caprina, es superior al 5%, la brucelosis en cerdos está localizada en las áreas de explotación intensiva y en grandes establecimientos de cría y no se dispone de información sobre la prevalencia nacional.

## **Salud Pública**

Aunque la población puede contraer brucelosis al consumir alimentos contaminados, desde 1932 se la considera como una enfermedad profesional que afecta a quienes se encuentran en contacto con animales o sus productos. En la década del 70 algunos estudios estimaban 20.000 enfermos nuevos cada año, de los cuales el 30% trabajaba en frigoríficos y el 70% en el área rural. La incidencia actual de brucelosis en el hombre es difícil de estimar, debido a la subnotificación de los casos. Los datos proporcionados por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), correspondientes al período 1987-1997, indicaban 4.055 casos y en el período 1998-2007 se registraron 3.073. En 2008 se implementó un sistema de notificación único, integrando el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud (SNVS) en su módulo clínico con el de laboratorio (SIVILA) y en el período 2008-

2011 se notificaron 1.342 casos. Sin embargo, por tratarse de una enfermedad controlada en sangre a transfundir, existe información del período 2000-2006, correspondiente a todas las provincias, que registra 20.875 individuos reactivos. Durante el período 1994-2013 en el Servicio de Brucelosis del INEI-ANLIS se recuperaron 595 cepas de *Brucella* procedentes de pacientes de 22 provincias (Tabla 2). En general la distribución de las cepas de *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* coincide con la especie animal que es explotada en cada región<sup>58, 61</sup>. En cambio, la brucelosis humana causada por *B. canis* es una zoonosis urbana emergente, poco frecuente probablemente por las limitadas posibilidades de diagnóstico. Las técnicas serológicas que se emplean de rutina en los laboratorios solo detectan anticuerpos anti-*Brucella* en fase lisa y *B. canis* tiene morfología rugosa<sup>67</sup>. El hombre adquiere la infección a través de los perros infectados o de sus secreciones.

El contagio con *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* es por consumo de alimentos contaminados, por contacto directo o indirecto con animales infectados o por accidentes de laboratorio. *B. melitensis* y *B. suis* son altamente patógenas, *B. abortus* y *B. canis* son moderadamente patógenas, mientras que *B. ovis* y *B. neotomae* parecen no afectar al hombre.

La incidencia de la enfermedad en el hombre está en relación directa con la infección en los animales domésticos. Hay un marcado aumento de casos coincidente con la época del año en que paren las ovejas, las cabras y los cerdos, aunque el período de riesgo es mayor con las vacas, por ser más larga la duración de la lactancia<sup>28</sup>.

Las bacterias del género *Brucella* penetran en el organismo por vía digestiva, respiratoria, cutánea y/o conjuntival<sup>113</sup>. En el primer caso el ingreso es a través de

las membranas del tracto intestinal, aunque también puede atravesar las mucosas del estómago. El riesgo al consumir leche cruda está relacionado con el estado del animal ya que la mayor cantidad de *Brucella* se libera al comienzo de la lactancia. El consumo de derivados lácteos contaminados como quesos cremosos, manteca, crema y helados es la forma más común de transmisión. Los quesos duros, el yogur y los productos lácteos ácidos son menos riesgosos debido a la fermentación láctica.

La infección por vía respiratoria ha sido comprobada en lugares donde se liberan aerosoles como laboratorios, frigoríficos, corrales de encierro de cabras o mataderos. Los accidentes por vía conjuntival han sido descritos al manipular vacunas de cepas vivas atenuadas, al realizar necropsias, asistir en partos o por llevar las manos contaminadas a los ojos. La infección a través de la piel con abrasiones se ha mencionado en casos de contacto con animales infectados, sus tejidos o durante la manipulación de cepas sin protección. Las tres últimas son las formas de infección más frecuentes en veterinarios, trabajadores rurales, operarios de frigoríficos o de mataderos <sup>77</sup>. En estos casos las actividades de mayor peligro son las relacionadas con la asistencia en los partos, la faena de animales y la limpieza de los utensilios, máquinas y vertederos donde se procesan. Se han descrito infecciones en áreas administrativas de plantas donde faenan animales atribuidas a la contaminación del aire.

La brucelosis puede ser adquirida por transfusión sanguínea y por trasplante de médula, cuando el dador es asintomático con bacteriemia <sup>2, 34</sup>. Esta forma de infección debe ser tomada en cuenta sobre todo en áreas endémicas. En el hospital, los pacientes constituyen un riesgo mínimo, sin embargo las muestras de sangre, secreciones y tejidos deben ser manipuladas siguiendo protocolos de bioseguridad. Difícilmente se transmite de una persona a otra por vía sexual, aunque se ha

confirmado la presencia de *Brucella* en exudado vaginal y semen <sup>68</sup>. También se ha informado la infección congénita y la transmisión a través de leche materna<sup>20, 76</sup>. La susceptibilidad a la infección depende del estado inmunitario y nutricional individual, del tamaño y la vía de penetración del inóculo y de la especie de *Brucella*.

**Tabla 2.** Cepas de *Brucella* aisladas de humanos en la Argentina entre 1994 y 2013  
INEI-ANLIS “Dr.Carlos G. Malbrán

Provincia	n	<i>B. abortus</i>			<i>B. melitensis</i>					<i>B. suis</i>		<i>B. canis</i>
		1	2	C19	1	1a	2a	2	3	1	1a	
Buenos Aires	329	73	5	9	38	6			2	108	82	6
Catamarca	19				18	1						
Córdoba	47	7	1		12		1			19	7	
Corrientes	1									1		
Chaco	2				2							
Formosa	2				2							
Entre Ríos	4									3		1
Jujuy	4				1	3						
La Pampa	17	1								13	2	1
La Rioja	25				24					1		
Mendoza	52				51					1		
Misiones	1									1		
Neuquén	5				3					2		
Rio Negro	3					1				1		1
San Juan	9				9							
San Luis	7				7							
Santa Cruz	1				1							
Santa Fe	24	1			3					10	9	1
Sgo. del										1		
Estero	2					1						
Salta	37				30	1		1		2	3	
Tierra del												1
Fuego	1											
Tucumán	3				1	2						
Subtotal		82	6	9	202	15	1	1	2	163	103	11
Total	595		97				221			266		11

## Impacto clínico

La enfermedad puede cursar en forma subclínica o con los síntomas descritos en la Tabla 3, que se exteriorizan 2-3 semanas posteriores a la infección aunque se han observado períodos de incubación más largos. Ocasionalmente, predomina el compromiso de algún órgano en particular y es cuando la enfermedad se considera localizada o complicada. Las complicaciones osteoarticulares, ocurren en el 30-40% de los casos e incluyen artritis, sacroileítis, bursitis y espondilitis <sup>14</sup>.

**Tabla 3.** Signos y síntomas observados en 500 pacientes (290 del sexo masculino) con brucelosis causada por *B. melitensis* <sup>28</sup>

Signos y síntomas	Número de pacientes (%)
Fiebre	464 (93)
Escalofríos	410 (82)
Sudoración	437(87)
Malestar	457(91)
Falta de energía	473(95)
Dolores articulares y de espalda	431(86)
Artritis	202(40)
Sensibilidad espinal	241 (48)
Cefaleas	403 (81)
Pérdida de apetito	388 (78)
Pérdida de peso	326 (65)
Constipación	234 (47)
Dolores abdominales	225 (45)
Diarrea	34 (7)
Tos	122 (24)
Dolor testicular/epidimitis/orquitis	62 (21)*
Erupción	72 (14)
Disturbio del sueño	185 (37)
Palidez	110 (22)
Linfadenopatías	160 (32)
Esplenomegalia	125 (25)
Hepatomegalia	97 (19)
Ictericia	6 (1)
Anormalidades del SNC	20 (4)
Soplo cardíaco	17 (3)
Neumonía	7 (1)

La tomografía computada, más sensible que la radiografía, es especialmente útil en el diagnóstico de espondilitis <sup>57</sup>. Cuando ésta es causada por *Brucella* generalmente afecta vértebras lumbares, mientras que la tuberculosis produce abscesos paraespinales.

Las complicaciones hepáticas se observan con frecuencia en infecciones por *B. melitensis*, aunque los valores de las pruebas funcionales suelen ser levemente anormales <sup>10</sup>. Algunas veces, los valores de las transaminasas están aumentados y hacen sospechar de alguna hepatitis de origen viral.

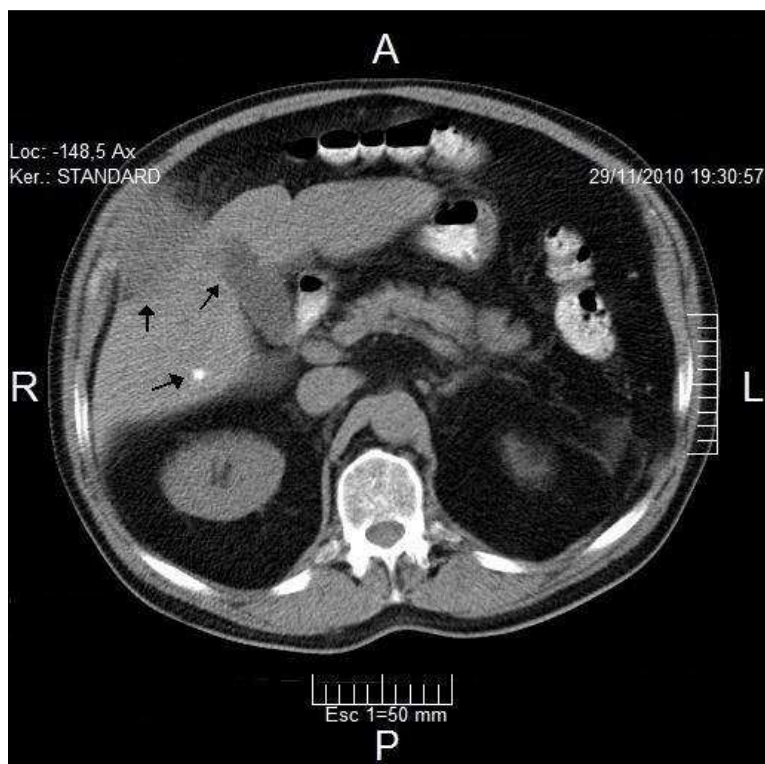
Los abscesos hepáticos y las lesiones supurativas crónicas se asocian con la infección por *B. suis* <sup>1,3</sup> (Fig.1).

Las complicaciones neurológicas ocurren en menos del 2% de los casos y la meningitis aguda o crónica es el síndrome más común <sup>33</sup>. En esos casos el líquido céfalo-raquídeo (LCR) presenta una elevada concentración de proteínas, una reducida concentración de glucosa y pleocitosis linfocítica. *Brucella* se aísla muy raramente de LCR, aunque el nivel de anticuerpos es alto, lo mismo que en el suero. El síndrome de Guillain Barré ha sido asociado con brucelosis causada por *B. melitensis* y con *B. canis* <sup>67, 107</sup>.

Otras complicaciones aunque poco frecuentes son las cardiovasculares, que se relacionan a los casos de muerte e incluyen miocarditis, pericarditis y aneurisma de aorta <sup>67, 92</sup>.

También se han descrito complicaciones genitourinarias, gastrointestinales y pulmonares <sup>52, 72, 78</sup>. Cuando los síntomas persisten por más de un año, la enfermedad se define como crónica y se suele explicar por la presencia de lesiones supurativas localizadas <sup>1</sup>.





**Figura 1.** Tomografía axial computada de la zona abdominal de un paciente con brucelosis. Las flechas muestran una masa calcificada y un absceso en el lóbulo derecho del hígado.

### **Definición de casos y clasificación**

En la Argentina se han aislado de humanos cepas de *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis* y *B. canis* (Fig. 2). Los casos se definen y clasifican de acuerdo a la “Guía para el equipo de salud, N° 12, Brucelosis”, Ministerio de Salud, 2013 <sup>45</sup>.

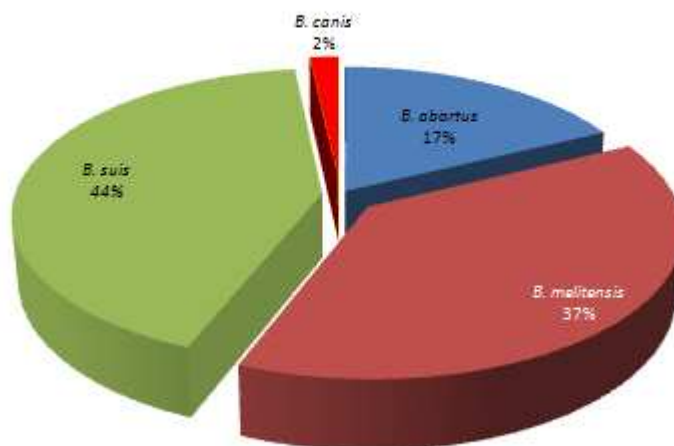
*Caso sospechoso:* Fiebre de comienzo agudo o insidioso y uno o más de los siguientes signos y síntomas: transpiración nocturna, fatiga, anorexia, pérdida de peso, cefalea, artralgia, mialgia, artritis, espondilitis, meningitis o afectación local de órganos (endocarditis, orquitis/epididimitis, hepatomegalia, esplenomegalia) y uno o más de los siguientes antecedentes epidemiológicos: contacto ocupacional con

animales, consumo de productos de origen animal contaminados, exposición de laboratorio, hijo de madre positiva, contacto con perros.

*Caso probable.* Caso sospechoso con una o más pruebas de tamizaje positivas [aglutinación con antígeno tamponado (BPA), Rosa de Bengala (RB), aglutinación en placa (Huddleson) o microaglutinación para *B. canis* (RSAT)].

*Caso confirmado.* Caso probable con uno o más de los siguientes criterios: estudios bacteriológicos positivos (aislamiento de *Brucella* sp. del espécimen clínico, hemocultivo, mielocultivo, biopsias, etc.), estudios serológicos positivos (prueba de Wright y otras que permiten la detección de isotipos IgG específicos en suero del paciente como fijación de complemento, cELISA o IELISA) o nexo epidemiológico con un caso confirmado.

*Caso descartado.* Dos muestras de suero con 30 días de diferencia en las cuales no se detectan anticuerpos anti-*Brucella* spp.



**Figura 2.** Especies de *Brucella* aisladas de humanos en la Argentina entre 1994 y 2013 (datos del INEI-ANLIS “Dr Carlos G. Malbrán”)

## Factores de virulencia

A las especies del género *Brucella* se las denomina patógenos silenciosos porque no poseen los factores de virulencia bacterianos clásicos como toxinas, proteasas, fimbrias o *pili*, ni demuestran una activación fuerte de la inmunidad innata.

*Brucella* ingresa al huésped a través de mucosas, principalmente de la vía digestiva o inhalatoria. Primero debe adherirse a la superficie de dichas mucosas a fin de no ser arrastrada por corrientes de aire o líquido, naturales en dichas vías. Luego, la bacteria debe colonizar las mucosas y penetrar en los tejidos hasta alcanzar los nódulos linfáticos para lograr una diseminación a través de fagocitos profesionales y así afectar a una gran variedad de tejidos y órganos. Queda establecida de esta manera la brucelosis.

Dentro de los fagocitos, *Brucella* es capaz de escapar de la vía endocítica para establecerse en una vacuola que deriva del retículo endoplásmico, denominada BCV (*bacteria-containing vacuole*) y allí replicar intensamente. También se ha observado por ensayos *in vitro* que *Brucella* es capaz de infectar, replicarse y sobrevivir en varios tipos celulares distintos de los fagocitos profesionales<sup>19, 93</sup>.

No se han encontrado para esta bacteria factores que le otorguen virulencia por sí mismos, es decir, que resulten ofensivos para el hospedero. En cambio, su patogenicidad se basa en la capacidad de sobrevivir intracelularmente. Todo esto hizo que los estudios de investigación científica se centraran en entender, a nivel molecular, los mecanismos utilizados por *Brucella* para poder replicarse y mantenerse viable dentro de las células eucarióticas. Así, teniendo en cuenta lo que se conoce hasta el momento, podemos decir que para esta bacteria es más

apropiado hablar de mecanismos estratégicos de patogenicidad en lugar de factores de virulencia.

Los estudios sobre estos mecanismos consisten generalmente en infectar *in vitro* con *Brucella* células provenientes de líneas celulares o de cultivos primarios obtenidos por ejemplo de ratón y evaluar a distintos tiempos el número de bacterias adheridas o internalizadas, así como también la respuesta inflamatoria de la célula hospedera infectada. El modelo de infección *in vivo* más usado es el de ratón, al cual se infecta por vía intraperitoneal u oral con las cepas en estudio y luego a distintos tiempos se les evalúa la carga bacteriana que hay en órganos como el hígado y el bazo. De este modo se establece el poder patógeno de la bacteria al invadir y colonizar estos órganos y se le confiere un grado de virulencia determinado en relación a otras cepas bacterianas.

La comparación entre los fenotipos, es decir los comportamientos observados en ensayos de laboratorio, de las cepas salvajes (cepas de referencia) y de los mutantes obtenidos a partir de ellas por técnicas de ADN recombinante, son los que permiten identificar distintos genes cuyos productos de expresión son los que participan directa o indirectamente en esos mecanismos estratégicos de sobrevivencia.

Por lo expuesto, lo que más se conoce en términos de moléculas que se asocian al poder patógeno de *Brucella* es su comportamiento individual frente a células eucarióticas. En este capítulo mencionaremos aquellas claramente identificadas hasta el momento, teniendo en cuenta las distintas etapas que definen un proceso infeccioso bacteriano.

## Adherencia

Un estudio realizado por Castañeda-Roldán y colaboradores <sup>22</sup> mostró que tanto *B. melitensis* como *B. abortus* son capaces de unirse a la superficie de células epiteliales y macrófagos, y formar microcolonias. En esta interacción hay un reconocimiento por parte de las bacterias de residuos con ácido siálico en la superficie de las células eucarióticas. También estos autores demostraron que las bacterias son capaces de unirse a la matriz extracelular eucariótica, contactando principalmente con fibronectina y vitronectina <sup>22</sup>. Las proteínas Sp41, BmaC y BtaE cumplen con estas características. SP41 es una proteína de superficie, codificada por el gen *ugpB*, que podría unirse al glicerol-fosfato <sup>23</sup>; mientras que BmaC y BtaE son proteínas que pertenecen a la familia de los autotransportadores de tipo I y tipo II respectivamente. BtaE reconoce al ácido hialurónico <sup>83</sup>. Para los mutantes en dichas proteínas tanto la adhesión como la invasión a las células eucarióticas se vio disminuida.

Cabe destacar que si bien se han descrito muchos genes que al ser mutados provocan una atenuación en la adherencia e invasión a las células eucarióticas, el producto de los mismos no está directamente involucrado en estos procesos sino que la mutación produce además una alteración en la superficie bacteriana. Son ejemplo de ello los genes que codifican para los reguladores transcripcionales BvrR y VjbR, para el glucano cíclico o el LPS <sup>89</sup>. Queda por investigar si existen también alteraciones en las moléculas expresadas en la superficie bacteriana cuando son mutados genes de vías metabólicas que brindan el mismo fenotipo. Un ejemplo es el de la enzima ferroquelatasa que participa del último paso en la vía de síntesis del grupo hemo <sup>5</sup>.

## Invasión

El LPS de *Brucella* es necesario para que la entrada de la bacteria a la célula sea a través de las balsas lipídicas (*lipid rafts*) que son microdominios de la membrana de macrófagos ricos en colesterol. El producto del gen *BMEI0216*, que parecería ser una proteína de membrana asociada a la transglucosidasa, es necesario para la entrada a las células epiteliales pero no a los macrófagos. No obstante falta evaluar su función biológica<sup>106</sup>. Contiguo a este gen se encuentra *invA* que codificaría para una invasina cuya función está también implicada en la invasión intracelular afectando también el establecimiento de la infección<sup>8</sup>.

Aunque aún no están identificados, no podemos dejar de mencionar los productos de los genes regulados por el sistema de dos componentes BvrR/BvrS dado que los mutantes en este sistema son menos invasivos, replican menos y no pueden escapar a la unión al lisosoma para ser degradados. Este sistema regula más de 120 genes entre los cuales se encuentran varios reguladores de la transcripción como *VjbR*, genes que participan del sistema de secreción de tipo IV, de la biosíntesis de ácidos grasos, lipoproteínas, metabolismo de carbono y nitrógeno, y varias proteínas de membrana externa como Omp25<sup>24, 104</sup>. Esto significa que las mutaciones tanto en *bvrR* como en *bvrS* resultan pleotrópicas y no permiten por sí solas la identificación de los factores que participan en cada paso de la invasión celular. Mutaciones en genes de otros sistemas de dos componentes como por ejemplo *FibS/R* y *TceS/R* también han demostrado su participación en el proceso de invasión<sup>56, 90</sup>.

Muchas veces se ven descritos en la bibliografía ensayos de infección, en los que se observa que la entrada de *Brucella* a la célula eucariótica está disminuida.

Sin embargo, faltan datos experimentales que permitan determinar si la discapacidad estuvo en la adhesión, en la invasión o en ambas.

Si bien se había demostrado anteriormente que cepas de *Brucella* podían adherirse a los glóbulos rojos tanto de sangre humana como animal, recientemente se ha reportado que *B. melitensis* es capaz de internalizarse en eritrocitos murinos y permanecer viable por varias semanas <sup>105</sup>. Este hallazgo implica que *Brucella* tendría otra estrategia para la diseminación sistémica y para la evasión ante el sistema inmune y agentes antimicrobianos.

### Resistencia y evasión

La membrana externa bacteriana es rica en fosfatidilcolina. Esta molécula junto al LPS están involucradas en la resistencia al complemento y a los péptidos antimicrobianos.

*B. abortus* tiene la capacidad de autoagregarse y producir *biofilms* adhiriéndose tanto a superficies celulares como abióticas y resistiendo al estrés por desecación <sup>6</sup>. Este hecho está indicando que esta bacteria es capaz de usar otra estrategia, compartida por otros microorganismos de vida extracelular, para resistir situaciones de estrés y evitar el contacto con anticuerpos y antibióticos. Falta aún identificar los componentes de la matriz extracelular que produce *Brucella* en estas circunstancias y evaluar si cumplen alguna función durante el ciclo de vida intracelular.

## Establecimiento en nicho

Más extenso es el trabajo realizado en torno al tráfico intracelular de cepas de *Brucella* al cual se lo complementó evaluando la respuesta molecular de la célula eucariótica al ser invadida. Se han realizado ensayos de transcriptomas y proteomas, aportando una gran cantidad de datos que deberán ser evaluados y confirmados para su correcta interpretación. En general se considera importante en esta etapa al LPS al que se supone interaccionando y modulando la membrana de la vacuola (BCV). El glucano cíclico  $\beta$ 1-2, el cual se encuentra en el periplasma, también juega un rol importante en esta etapa aunque todavía no esté bien definido. Se han identificado algunos efectores del sistema de secreción de tipo IV como son VceA, VceC, RicA, BPE123, BPE043, BPE05, BPE275 y se supone que junto a otros, aún no identificados, estarían participando activamente en el tráfico intracelular<sup>53</sup>. Por último también están implicados los reguladores transcripcionales BvrR y VjbR<sup>106</sup>.

## Adaptación al estrés y replicación bacteriana intracelular

Para poder hacer frente a las situaciones de estrés dentro de una célula eucariótica como la falta de oxígeno o la presencia de especies reactivas y poder replicarse, *Brucella* expresa aquellos genes que también le permiten resistir ese tipo de estrés durante su ciclo de vida extracelular. Esto surge de los estudios que permitieron la identificación de los genes inducidos intracelularmente o del análisis de la infectividad de mutantes<sup>12, 31, 89</sup>. Si bien son las mismas moléculas, estos resultados han servido para caracterizar el compartimento donde *Brucella* se replica.



Además del ambiente reducido en oxígeno, debe resistir la acidez y la falta de algunos nutrientes. La lista entonces de estas moléculas relacionadas con la estrategia de supervivencia intracelular es larga y podría involucrar a muchas otras que tampoco son exclusivas de esta etapa del ciclo de vida bacteriano. Además, la expresión de los genes codificantes puede variar de acuerdo al tipo de célula eucariótica que habite. Por esto no deberían ser consideradas como factores de virulencia.

### Ataque y diseminación

Existen moléculas de *Brucella* aún no identificadas que evitan la muerte programada celular. También se supone la existencia de otras que resultan citotóxicas para macrófagos y que utilizan el sistema de secreción de tipo IV<sup>19</sup>. Se desconoce si *Brucella* se disemina únicamente por vía intracelular<sup>106</sup>.

### Salida del hospedero

No se conocen los mecanismos por los cuales *Brucella* sale de la célula fagocítica para invadir otro tipo celular. Recientemente, se ha demostrado tanto en macrófagos como en células epiteliales, que la BCV de *B. abortus* madura hacia formas semejantes a las denominadas autofagosomas para dar lugar a lo que los autores denominan aBCV (vacuolas autofágicas que contienen bacterias). Lo que observan es que las BCV se rodean de una capa membranosa que adquiere algunos de los marcadores de la vía autofágica y que las bacterias mantienen su viabilidad. Esto podría significar una vía de escape de la célula<sup>100</sup>. Otra vía descrita

estaría mediada por el aumento de la citotoxicidad de *B. melitensis* al disociarse dentro del macrófago. Esto le permitiría salir del hospedero e infectar a las células contiguas<sup>82</sup>.

## **Diagnóstico microbiológico**

### **Identificación a nivel de género y especie**

El diagnóstico bacteriológico aporta una valiosa información epidemiológica ya que es indicador de la fuente de infección y de la probable localización geográfica. Las cepas se pueden recuperar del paciente a partir de sangre, médula ósea, LCR, líquido articular, biopsias u otros materiales<sup>96</sup>.

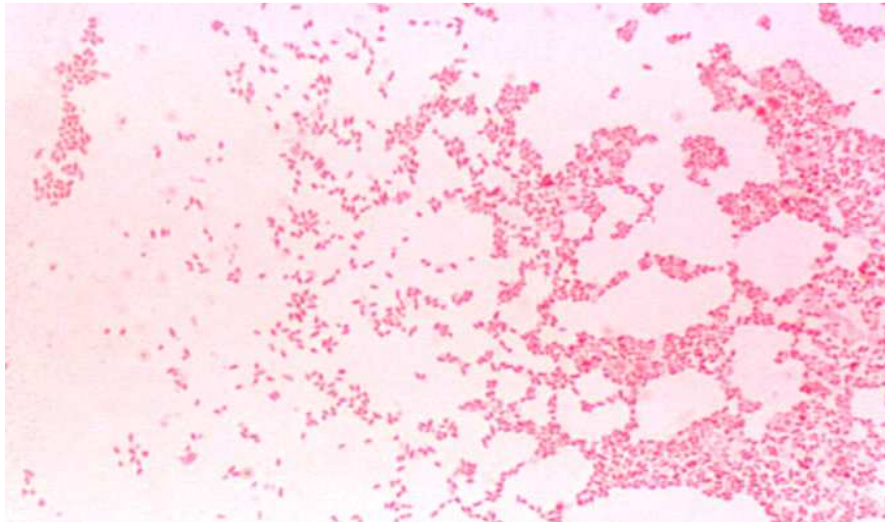
Se recomiendan tres muestras de hemocultivo en medio de cultivo monofásico en un período de 24 h, preferentemente durante la etapa febril del paciente. La incubación se realiza a 35-37 °C en atmósfera con 5-10% de CO<sub>2</sub> para asegurar el crecimiento de todas las cepas. Las muestras en medios de cultivo para sistemas automatizados como BACTEC o BacT/ALERT se manejan de acuerdo a las instrucciones del equipo<sup>110</sup>. Cuando se emplean medios de cultivo líquidos estáticos se requieren pasajes periódicos a medio de cultivo sólido para evitar la disociación de las colonias. Sin embargo, con los medios de cultivo bifásicos se evitan estos pasajes. Generalmente los hemocultivos requieren un período de incubación prolongado, por esa razón no se descartan como negativos antes de los 30 días. Las colonias, pequeñas, translúcidas y de bordes lisos, se pueden visualizar en un medio de cultivo sólido a partir de las 48 h de incubación. En la tinción de un extendido a partir del cultivo se presentan como pequeños cocobacilos gram

negativos de 0,5-0,7 x 0,6-1,5  $\mu\text{m}$  que eventualmente pueden estar en pares o en pequeños grupos <sup>27</sup> (Fig. 3).

Las coloraciones (Gram, Koster, Ziehl Neelsen) y la observación de la morfología de las colonias, ayudan a excluir otros gérmenes. No se observa coloración bipolar, no presentan cápsula, no son móviles ni forman esporas. Resisten la decoloración con ácidos débiles y se tiñen de rojo en la coloración de Ziehl Neelsen modificada. Las colonias tienen apariencia estable pero cuando los cultivos envejecen, pueden aparecer formas pleomórficas. No producen indol, no licúan la gelatina, no producen acetilmetilcarbinol, no lisan glóbulos rojos y son negativas a la prueba de rojo de metilo. Son catalasa positivas y a excepción de *B. ovis* y *B. neotomae*, son oxidasa positivas. No producen ácidos en medios con carbohidratos (excepto *B. neotomae*) y en el medio de MacConkey no fermentan la lactosa. El género *Brucella* puede ser confundido con otras bacterias gram negativas. Las más comunes son *Bordetella bronchiseptica*, *Psychrobacter phenylpyruvicus*, *Acinetobacter* spp., *Oligella ureolytica*, *Campylobacter fetus* y *Yersinia enterocolítica* O9. Algunas de sus características diferenciales están detalladas en la Tabla 4.

Cuando se utilizan equipos comerciales para identificar microorganismos gram negativos, el género *Brucella* puede ser confundido en el API 20NE (sistema para identificar gérmenes no entéricos) con *Psychrobacter phenylpyruvicus*, en el MicroScan Negative COMBO tipo 5, con especies de *Psychrobacter* y en el panel HNID (identificación de *Haemophilus* y *Neisseria*) con *Haemophilus influenzae* biotipo IV. Un ensayo preliminar que orienta en la identificación consiste en suspender una colonia en 30  $\mu\text{l}$  de solución salina normal colocada en un portaobjetos, agregar 30  $\mu\text{l}$  de suero policlonal anti-S-*Brucella*, rotar lentamente y

observar si hay aglutinación. Para complementar el estudio se usa suero anti-R-*Brucella*.



**Figura 3.** Coloración de Gram de colonias de *Brucella* spp.

### **Características del cultivo**

La mayoría de las especies de *Brucella* cuyo aislamiento es reciente crecen muy lentamente. Sus requerimientos nutricionales son complejos y necesitan que el medio de cultivo contenga aminoácidos, tiamina, biotina, nicotinamida, hierro y magnesio. Muchas especies necesitan también pantotenato de calcio y meso-eritritol pero en general la adición de suero o sangre al medio de cultivo favorece el crecimiento de todas.

Son bacterias aerobias pero algunas especies crecen mejor en condiciones de microaerobiosis con una temperatura y pH óptimos de 37 °C y 6,6 a 7,4 respectivamente. Al metabolizar las proteínas o peptonas del medio de cultivo, la

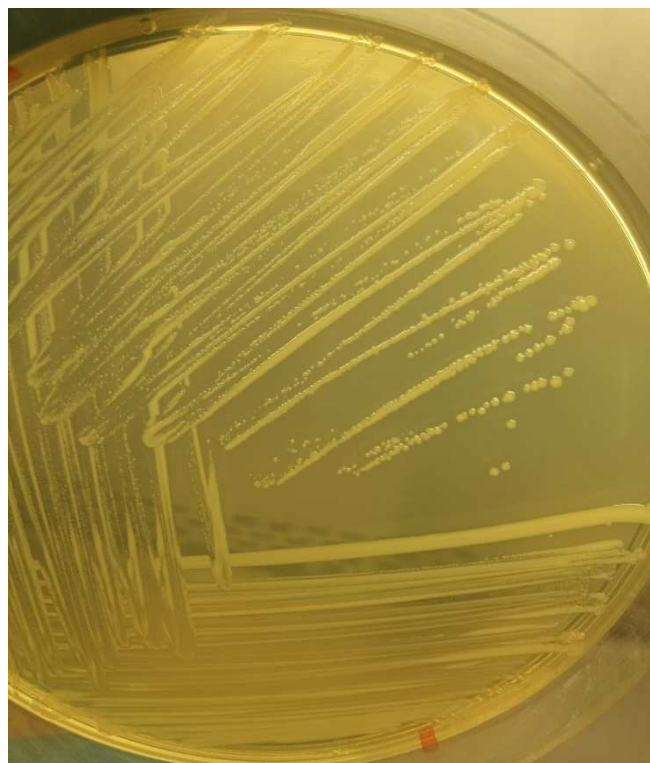
mayoría de las especies producen álcalis y esa característica actúa como factor limitante del crecimiento. La presión osmótica adecuada es entre 2 y 6 atmósferas, equivalente a NaCl 0,05-0,15M. El medio de cultivo comercial deshidratado *Brucella* Agar BBL™ (BD) es el indicado para el crecimiento de la mayoría de las especies aunque el agregado de 3-5% de suero equino descomplementado (BDS) facilita el crecimiento de todas.

Si el material está contaminado se recomienda utilizar un medio de cultivo básico adicionado de antibióticos como el descrito por Kuzdas Morse (KM), sin embargo las cepas de *Brucella* muy sensibles pueden ser inhibidas. Por eso se siembra el material por duplicado en el medio básico y en el medio suplementado con antibióticos. El citrato de sodio al 2,5% adicionado al medio de cultivo líquido resulta un anticoagulante que no interfiere en el aislamiento de *Brucella*, mientras que los medios de cultivo sólidos son apropiados para la observación de la morfología de las colonias.

Aunque puede haber variaciones dentro de una misma especie en general *B. suis* biovar 1, *B. suis* biovar 3 y *B. canis* son de crecimiento rápido mientras que *B. ovis*, *B. melitensis* y *B. suis* biovar 2 son más lentas; las otras especies tienen velocidad de crecimiento intermedia. Las colonias pueden ser visibles a partir de las 48 h con un tamaño de 0,5 a 1,0 mm de diámetro (Fig. 4). De acuerdo a la morfología se pueden distinguir las cepas lisas con superficie convexa y brillante (L) (Fig. 4) de las intermedias (I) con un halo tenue de diámetro variable, las rugosas (R) de apariencia opaca levemente granular y las mucoides (M) de textura viscosa. La variación de la morfología de las colonias puede suceder por disociación de las formas lisas ante condiciones adversas para su crecimiento, como la falta de humedad, de nutrientes, de temperatura adecuada o de oxígeno en condiciones

estáticas.

Algunas especies como *B. ovis* y *B. canis* son rugosas estables por falta de la cadena O, del LPS de la pared celular probablemente debido a una deleción genética. Si bien las especies de *Brucella* no son hemolíticas, en los cultivos envejecidos puede verse alrededor de las colonias una cierta decoloración que podría explicarse por la formación de álcalis. Todas las especies son inactivadas por calor a  $\geq 85$  °C.



**Figura 4.** Colonias de *Brucella* con 96 h de incubación en medio de cultivo agar triptosa

### Identificación y tipificación

Cuando se sospecha que la cepa aislada puede pertenecer al género *Brucella*, luego de diferenciarla de otros gérmenes gram negativos (Tabla 4), es

conveniente enviarla al laboratorio Nacional de Referencia para su confirmación <sup>61</sup>. El género, especie y biovariedades se definen realizando los ensayos indicados en la Tabla 5 <sup>7, 27, 74</sup> incluyendo como control cepas de referencia: *B. abortus* biovar 1, 544; *B. melitensis* biovar 1, 16M y *B. suis* biovar 1, 1330. Cuando la cepa investigada pertenece a otra biovariedad o especie, se incluye la cepa de referencia correspondiente (Tabla 6). Los estudios se realizan en cultivos puros. Cuando se encuentran mezcladas colonias lisas y rugosas se deben aislar las colonias lisas antes de efectuar los ensayos<sup>7</sup>.

#### Necesidad de CO<sub>2</sub>

El CO<sub>2</sub> es utilizado por *B. abortus* y *B. ovis* para disminuir el pH, bajar la tensión de O<sub>2</sub> y como nutriente para la síntesis de alanina, glicina y pirimidina. Las cepas se siembran por duplicado en tubos de BD y se incuban a 36 °C +/- 1 °C, en atmósfera normal y enriquecida con 5-10% v/v de CO<sub>2</sub> para diferenciar las dependientes de CO<sub>2</sub>. La lectura se realiza a las 48 h.

#### Requerimiento de suero

*B. abortus* biovar 2 y *B. ovis* necesitan para crecer el agregado de 3-5% de suero equino o de conejo al medio de cultivo básico. Estas cepas son muy sensibles a los factores inhibidores de algunas peptonas que se encuentran en los medios de cultivo. El suero interviene neutralizando los componentes inhibidores y también aportando nutrientes. Para observar esta característica se siembra la cepa por duplicado en medio de cultivo básico (BD) y en medio de cultivo básico con suero (BDS). Los tubos se incuban a 36 °C +/- 1°C en atmósfera que contenga 5-10% de

CO<sub>2</sub>. La lectura se realiza a las 48 h.

### Producción de sulfuro de hidrógeno

Algunas cepas del género *Brucella* producen H<sub>2</sub>S a partir de aminoácidos azufrados contenidos en el medio de cultivo. Para detectarlo se utilizan tiras de papel de filtro que contienen solución de acetato de plomo (10% p/v), las cuales se colocan en la boca de los tubos sin que toquen el medio de cultivo. Se cambian diariamente durante 4 días, utilizando una pinza estéril y observando el ennegrecimiento producido por el sulfuro de plomo que se compara con el liberado por las cepas de referencia. *B. suis* produce H<sub>2</sub>S, *B. abortus* y *B. neotomae* lo hacen con moderación, en cambio *B. canis*, *B. melitensis* y *B. ovis* no lo producen.

### Actividad de la ureasa

La mayoría de las cepas de *Brucella* hidrolizan la urea pero *B. suis*, *B. neotomae* y *B. canis* tienen mayor actividad. Para visualizar esta prueba se utiliza el método de Bauer que emplea un sustrato libre de sustancias promotoras de crecimiento. Se trata de una solución de fosfato monosódico (NaPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>) 0,125 M y rojo de fenol al 0,0015 % en agua destilada, se ajusta el pH a 4,00 con HCl 1N y se agrega urea al 5%. Se distribuye en cantidades de 1 ml en tubos con tapa de rosca y se suspende en ellos la cepa problema y los patrones de referencia. Se incuba a 36 °C +/- 1 °C y se lee a los 15, 30, 60 y 90 minutos. El ensayo es positivo cuando el color del indicador vira al púrpura.



## Crecimiento en presencia de sustancias bacteriostáticas

Un criterio que se utiliza para diferenciar cepas de *Brucella* es su habilidad para crecer en medios de cultivo con sustancias bacteriostáticas, en varias diluciones. También se emplean medios de cultivo que contengan alcohol polihidroxiado y antibióticos. Los bacteriostáticos preparados al 0,1% en agua destilada y esterilizados por calentamiento a 100 °C durante una hora, se pueden conservar en frascos color ámbar hasta tres meses. El alcohol polihidroxiado, en solución acuosa concentrada, se esteriliza por filtración y se conserva a -20 °C +/- 4 °C en alícuotas que se descongelan en el momento del uso. Los antibióticos preparados en solución concentrada, en agua destilada estéril, se pueden conservar durante una semana a 5 °C ± 2 °C. En todos los casos el medio básico es el BD, al cual luego de esterilizado y enfriado a 56°C, se le agregan los colorantes, antibióticos o alcohol polihidroxiado de acuerdo a las concentraciones finales indicadas en la Tabla 5.

## Fagotipificación

Se utilizan tres fagos, Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb) y RC (propagado en R-*Brucella*). Se emplean en la dilución habitual de la prueba (RTD, del inglés, *routine test dilution*) que es la menor concentración de fagos que produce lisis completa en su cepa de propagación <sup>26</sup>.

## **Mantenimiento de los cultivos**

Para evitar las variaciones que se producen con los pasajes sucesivos en los

medios de cultivo, las cepas de *Brucella* se conservan a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en nitrógeno líquido o liofilizadas. En todos los casos la suspensión, de cultivos puros en fase logarítmica de crecimiento, se hace en un vehículo protector que contiene 5% de sacarosa, 2,5% de Bacto Casitone® (Difco), 1% de glutamato de sodio y 15% de leche descremada. Se utilizan criotubos, ampollas dobles de liofilización o viales dobles para nitrógeno líquido respectivamente. Las cepas liofilizadas no deben sobrepasar los  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante el proceso, se debe mantener una humedad residual de 1-3% y conservarse a  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante el almacenamiento.

**Tabla 4.** Características que diferencian al género *Brucella* de otros microorganismos gram negativos

Pruebas	<i>Brucella</i> spp.	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Yersinia enterocolítica</i>
Morfología	Cocobacilos	Cocobacilos	Bacilos en forma de coma	Cocobacilos	Diplococos, cocobacilos y bacilos	Bacilos
Movilidad a 37 °C	-	+	+	-	-	-
Movilidad a 20 °C	-	-	-	-	-	+
Fermentación de lactosa	-	-	-	± <sup>(1)</sup>	±	-
Fermentación de glucosa	- <sup>(2)</sup>	-	-	-	±	+
Hemólisis en agar sangre	-	+	-	±	±	-
Catalasa	+	+	+	±	+	+
Oxidasa	+ <sup>(3)</sup>	+	+	+	-	-
Ureasa	+ <sup>(4)</sup>	+	-	±	±	+
Reducción de nitratos	+ <sup>(5)</sup>	+	+	±	±	+
Utilización de citrato	-	+	-	-	-	-

<sup>(1)</sup> En el género hay especies positivas y negativas

<sup>(2)</sup> *B. neotomae* puede fermentar la glucosa

<sup>(3)</sup> *B. ovis*, *B. neotomae* y algunas *B. abortus* son negativas

<sup>(4)</sup> *B. ovis* y algunas *B. abortus* son negativas

<sup>(5)</sup> *B. ovis* es negativa

**Tabla 5.** Características diferenciales de las especies del género *Brucella*<sup>28, 41, 74</sup>

Cepa/biovar	Morfología de la colonia	Requiere suero	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> S	Medio de cultivo con:				Aglutinación con suero (d)			Lisis por fagos (e)		
					Tionina	Fucsina	Ureasa	Oxidasa	A	M	R	Tb	Wb	RC
					(a)	básica (a)	(b)							
<i>B. melitensis</i> 1	L	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+/-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	L	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+/-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	L	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+/-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>B. abortus</i> 1	L	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+/-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
2	L	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+/-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
3	L	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+/-)	(+) c	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
4	L	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+/-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
5	L	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+/-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
6	L	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+/-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
9	L	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+/-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
<i>B. suis</i> 1	L	(-)	(-)	(++)	(+)	(-)	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
2	L	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
3	L	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
4	L	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(++)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
5	L	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(++)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
<i>B. ovis</i>	R	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
<i>B. neotomae</i>	L	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(++)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+/-)	(+)	(-)
<i>B. canis</i>	R	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(++)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
<i>B. ceti</i>	L	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+/-)	(+)	(-)
<i>B. pinnipedialis</i>	L	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+/-)	(+)	(-)
<i>B. microti</i>	L	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
<i>B. inopinata</i>	L	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+/-)	(-)	(-)

Con el agregado al medio de cultivo de 1 mg/ml de m-eritrol crecen todas las especies

(a): 20 µg/ml; (b): método de Bauer; (c): excepto algunas cepas

(d): A: antisuero monoespecífico A; M: antisuero monoespecífico M; R: antisuero anti (R) *Brucella*

(e): A 1 RTD, dilución habitual de la prueba

(-): negativo; (+/-) positivo débil; (+): positivo; (++) positivo fuerte

L: lisa R: rugosa

**Tabla 6.** Cepas de referencia de las especies y biovariedades del género *Brucella*<sup>28</sup>, 41, 74

Especie	Biovar	Cepa	ATCC	NCTC
<i>B. melitensis</i>	1	16M	23456	10094
	2	63/9	23457	10508
	3	Ether	23458	10509
<i>B. abortus</i>	1	544	23448	10093
	2	86/8/59	23449	10501
	3	Tulya	23450	10502
	4	292	23451	10503
	5	B3196	23452	10504
	6	870	23453	10505
<i>B. suis</i>	9	C68	23455	10507
	1	1330	23444	10316
	2	Thomsen	23445	10510
	3	686	23446	10511
	4	40	23447	11364
	5	513	-	-
<i>B. neotomae</i>		5K33	23459	10084
<i>B. ovis</i>		63/290	25840	10512
<i>B. canis</i>		RM6/66	23365	10854
<i>B. ceti</i>		B1/94	-	-
<i>B. pinnipedialis</i>		B2/94	-	-
<i>B. microti</i>		CCM 4915	-	-
<i>B. inopinata</i>		B01	-	-

## Métodos moleculares

La disponibilidad de técnicas basadas en el diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas, en particular la tecnología de la amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha incrementado la diversidad de metodologías útiles para el diagnóstico de laboratorio en brucelosis humana y animal<sup>114</sup>.

Los ensayos basados en PCR, adoptados como herramientas diagnósticas en microbiología clínica, han demostrado ser rápidos (los resultados son obtenidos en pocas horas), sensibles y específicos comparados a las técnicas microbiológicas y serológicas tradicionales <sup>112</sup>.

Debido a la plasticidad de la técnica de PCR, numerosos protocolos han sido desarrollados desde la primera descripción sobre la aplicación de PCR para la identificación de *Brucella* <sup>35</sup>.

La PCR se emplea en tres contextos de estudio de la brucelosis: la detección directa de *Brucella* en muestras clínicas, la identificación y tipificación de aislamientos y la trazabilidad epidemiológica de cepas actuantes.

#### Detección molecular de *Brucella* spp. en muestras clínicas

Para la ejecución de pruebas moleculares, el primer paso metodológico es la obtención del ácido nucleico a partir de la muestra en estudio. Esta etapa es muy importante ya que los parámetros de sensibilidad y especificidad de la reacción se ven afectados conformes al método de extracción empleado y a la muestra elegida. Así, la elección de la muestra biológica correcta es importante para obtener resultados confiables. En brucelosis, la técnica de PCR ha sido aplicada a material genético proveniente de muestras en matriz líquida (sangre, suero, leche, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, líquido abomasal) y en matriz sólida, como diversos tejidos (bazo, hígado, placenta, epidídimo, testículo) <sup>18</sup>. Para la obtención del ADN se pueden emplear métodos propios o comerciales, aunque a la fecha no se ha realizado ningún estudio que defina a un protocolo optimizado y estandarizado <sup>84</sup>. Debido a que en la PCR directa se detecta el ADN de *Brucella* y no requiere

manipular muestras biológicas con bacterias viables, se reduce el riesgo de infecciones para el laboratorista por procesar material inactivado. Es necesario tener presente que la PCR no detecta bacterias viables, con lo que un resultado positivo no indica una infección activa.

Las bacterias de la familia *Brucellaceae* poseen una alta homología a nivel de ADN <sup>103</sup>, lo que ha facilitado el diseño de protocolos útiles para la identificación del género empleando un único par de cebadores. Las regiones de interés a amplificar más empleadas comprenden a los *loci* *IS711* <sup>75</sup>, *bcs31*<sup>11</sup> y *16S rRNA*<sup>48</sup> (Tabla 7) que involucran secuencias específicas de *Brucella*.

**Tabla 7.** Iniciadores específicos para la detección de ADN de *Brucella* por PCR

Gen blanco	Oligonucleótidos	Secuencia 5'-3'	Referencia
Proteína de 31 KDa de <i>B. abortus</i> ( <i>bcs31</i> )	B4	TGGCTCGGTTGCCAATATCAA	11
	B5	CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG	
Proteína de membrana externa de <i>B. abortus</i> ( <i>omp2</i> )	JPF	GCGCTCAGGCTGCCGACGCAA	55
	JPR	ACCAGCCATTGCGGTCTGGTA	
16S rRNA de <i>B. abortus</i>	F4	TCGAGCGCCCGCAAGGGG	87
	R2	AACCATAGTGTCTCCACTAA	
16S rRNA de <i>B. abortus</i>	Ba148–167F	TGCTAATACCGTATGTGCTT	48
	Ba928–948R	TAACCGCGACCGGGATGTCAA	

La sensibilidad analítica de la PCR ha demostrado estar en el orden de los 50 fg por reacción <sup>71</sup>, lo que equivale a la detección de cinco bacterias en el volumen de muestra evaluado. Esta alta sensibilidad corresponde a la situación óptima donde se titulan por amplificación diluciones de ADN purificado a partir de cultivos de *Brucella*.



Estos valores de sensibilidad pueden cambiar enormemente en función de la matriz clínica de donde proviene el ADN en estudio <sup>15</sup>.

Aunque al presente no se han realizado estudios que involucren múltiples laboratorios con el objetivo de determinar la reproducibilidad del ensayo ni el metaanálisis de los datos generados sobre la sensibilidad y especificidad diagnóstica de la PCR, se acepta que estas metodologías ofrecen una sensibilidad semejante o superior al aislamiento microbiológico y una especificidad superior a las pruebas serológicas <sup>4</sup>.

Entre las limitaciones de la PCR se pueden mencionar la generación de resultados falsamente positivos y negativos <sup>71</sup>.

Los resultados falsamente positivos pueden deberse a la contaminación entre muestras (durante el proceso de purificación del ADN en estudio), aunque la causa más frecuente se debe a la contaminación de reactivos o del instrumental con amplicones. Para minimizar resultados falsamente positivos es necesario adoptar conductas que reduzcan el riesgo de contaminación por aerosoles y disponer de una infraestructura edilicia que minimice la superposición entre el área de la preparación de la reacción y la de detección (observación del resultado en geles de agarosa coloreados con intercalantes fluorescentes expuestos a la luz ultravioleta).

Los resultados falsamente negativos se deben generalmente a la acción de inhibidores enzimáticos de la ADN polimerasa que pueden estar presentes en algunas muestras biológicas, como pueden ser el grupo hemo en muestras de sangre o de anticoagulantes como la heparina. La ingeniería molecular de la Taq ADN polimerasa permite disponer en la actualidad de enzimas más tolerantes a los inhibidores mencionados <sup>115</sup>.

Un avance metodológico al diagnóstico molecular de brucelosis ha sido la introducción de la PCR en tiempo real (RT-PCR) <sup>85, 86</sup>. Mediante RT-PCR se mejora la sensibilidad y la especificidad de detección y además se minimizan los riesgos de contaminación, por reducción de la generación de amplicones ambientales.

Los ensayos moleculares pueden contribuir significativamente en el diagnóstico de pacientes con brucelosis, aunque será necesaria la optimización y estandarización de las técnicas para lograr consistencia y confiabilidad en los resultados antes de que las mismas puedan ser incorporadas en el laboratorio de diagnóstico de rutina.

#### Identificación, tipificación y trazabilidad de aislamientos bacterianos mediante PCR

La identificación de especies de *Brucella* es de gran importancia epidemiológica. La tipificación convencional de aislamientos de *Brucella* es una actividad especializada. Son pocos los laboratorios que cuentan con los recursos humanos y de infraestructura requeridos.

Las técnicas basadas en PCR para identificar especies de *Brucella* son rápidas, bioseguras y representan una alternativa respecto a las técnicas convencionales. La disponibilidad de las secuencias genómicas de las especies zoonóticas de *Brucella* <sup>32, 47, 81</sup> y el análisis bioinformático comparativo <sup>47</sup> han servido de plataforma para el diseño de cebadores específicos para la identificación rápida de dichas especies. Las reacciones de identificación utilizan como templado ADN purificado proveniente de aislamientos microbiológicos de *Brucella*. Así, actualmente y en pocas horas se puede identificar la especie correspondiente de un aislamiento

40.

La epidemiología molecular contribuye en forma significativa al análisis y entendimiento de infecciones causadas por bacterias patógenas <sup>102</sup>. En los estudios epidemiológicos, los métodos de tipificación molecular pueden ser utilizados para rastrear el origen de una infección y el modo en que se distribuye. Por lo tanto, en los programas de control y erradicación de la brucelosis es de utilidad contar con métodos rápidos y certeros de tipificación, aunque disponer de estas metodologías en *Brucella* no ha sido sencillo debido al alto grado de homología genética entre sus especies <sup>103</sup>.

La información generada por la secuenciación de genomas también ha sido esencial para el desarrollo de metodologías basadas en PCR que permitan identificar de manera certera el perfil genético de un aislamiento para poder subtipificarlo <sup>38</sup>. Estas metodologías, como MLST (*multiple locus sequencing typing*) <sup>109</sup> o MLVA (*multiple locus variable tandem repeats analysis*) <sup>17, 54</sup> permiten discriminar entre aislamientos no relacionados de *Brucella* que no podrían ser diferenciados por métodos microbiológicos clásicos. Los perfiles resultantes de estos análisis pueden ser altamente discriminatorios <sup>54</sup>.

Actualmente MLVA es el método molecular más empleado para la subtipificación de *Brucella* ya que cumple los criterios de calidad recomendados para un ensayo de tipificación: reproducibilidad, estabilidad, poder discriminatorio, concordancia epidemiológica y concordancia con otros tipos de técnicas <sup>16</sup>.

## **Diagnóstico serológico**

Los métodos serológicos se emplean como prueba indirecta de la infección ya que la bacteriología no siempre es positiva. En este tipo de diagnóstico se debe

tener en cuenta que el género *Brucella* presenta una estructura antigénica compleja, que la inmunidad no es estimulada igualmente por los distintos antígenos y que las respuestas varían con el estado de la infección. Un resultado positivo puede indicar infección activa, anticuerpos que persisten después de la recuperación, contacto accidental con el germen no necesariamente seguido de enfermedad o exposición a un microorganismo que presente reacción cruzada con *Brucella*. Es por eso que mientras el aislamiento bacteriológico tiene una sola interpretación, los resultados serológicos deben estudiarse en conjunto con los datos clínicos y epidemiológicos.

Las células lisas de *Brucella* contienen en la membrana externa un lipopolisacárido (S-LPS) que la cubre casi totalmente y estimula la respuesta de anticuerpos. Además, se encuentran proteínas (OMP) y un polisacárido llamado hapteno nativo, polisacárido B o componente uno, de acuerdo al método de extracción. En el citoplasma se han identificado proteínas de significación diagnóstica, que están presentes en fracciones solubles de cepas lisas y rugosas. Las pruebas serológicas se pueden realizar con antígenos de células enteras, S-LPS, extractos celulares o proteínas purificadas. Los métodos clásicos para el diagnóstico de infecciones causadas por *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* emplean antígenos de células enteras de *B. abortus* en fase lisa, que detectan anticuerpos anti S-LPS. Pueden presentarse casos de reacción cruzada con algunas bacterias de importancia clínica como *Francisella tularensis*, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholerae*, *Salmonella* grupo N y *Stenotrophomonas maltophilia*<sup>52</sup>. Las técnicas de aglutinación en placa (Huddleson), con antígeno tamponado (BPA), rosa de Bengala (RB), en tubo (Wright), 2- mercaptoetanol (2ME) y fijación de complemento (FC) continúan siendo útiles en el diagnóstico. Es importante usar antígenos estandarizados para asegurar la uniformidad de los resultados. La prueba de

aglutinación rápida en placa (Huddleson) se encuentra en desuso y en la actualidad ha sido reemplazada por BPA o RB. Estas últimas, por su bajo pH, privilegian la aglutinación de las inmunoglobulinas tipo IgG y reducen de este modo las reacciones inespecíficas. BPA es ligeramente más sensible que RB y se recomienda para el estudio de brucelosis en sangre a transfundir. La prueba de Wright detecta isotipos IgM, IgG e IgA en el suero, es de baja especificidad y no es recomendable en casos crónicos. La prueba de 2ME se realiza conjuntamente con la de Wright, utilizando el reactivo, que es tóxico, para reducir las IgM presentes en el suero. La FC es sensible y específica, detecta anticuerpos de tipo IgG que predominan en casos crónicos, pero tiene el inconveniente de ser muy laboriosa y poco apropiada para casos agudos. Con frecuencia en pacientes con brucelosis, se observan recaídas que se relacionan con un tratamiento inapropiado de antibióticos, virulencia de la cepa o respuesta inmunológica deficiente. Algunos investigadores han informado la aparición de un segundo pico de IgG e IgA, como indicadores de recaídas<sup>66, 98</sup>. También se ha observado que a menudo se detectan bajos niveles de anticuerpos, varios meses después del tratamiento en pacientes que presentaron una evolución clínica satisfactoria. La significación de este hecho es difícil de establecer ya que no se puede definir con certeza el tiempo de la eliminación intracelular de *Brucella* y tampoco existe un criterio seguro de cura de la enfermedad. La continuidad del título de anticuerpos en el suero después del tratamiento, se debe principalmente a isotipos de IgG e IgA en la mayoría de los pacientes, independientemente del cuadro clínico<sup>42</sup>. La persistencia de IgG por sí misma, no parece ser indicador de infección crónica, aunque algunos autores señalan que lo es, cuando el paciente no presenta altos títulos al comienzo de la enfermedad. Las modernas pruebas de unión primaria tienen la ventaja de su alta

sensibilidad y especificidad, detectan anticuerpos incompletos, comunes en los pacientes crónicos y reducen la reacción cruzada con otros gérmenes gram negativos. cELISA es una prueba de ELISA de competición que utiliza un anticuerpo monoclonal específico para una porción de la cadena “O” del S-LPS de *Brucella*, que compite con los anticuerpos del suero por el antígeno fijo en el soporte sólido. Ha demostrado tener una sensibilidad del 98,3% y una especificidad del 99,7%. La prueba de cELISA detecta casos agudos y crónicos. El inmunoensayo de polarización fluorescente (FPA), tiene la ventaja de realizarse en tubos de vidrio de 12 x 75 mm, que se pueden volver a usar luego de su lavado, se realiza en pocos minutos, tiene una sensibilidad del 96,1% y una especificidad del 97,9%. Al igual que el cELISA detecta casos agudos y crónicos, pero tiene el inconveniente de dar resultados erróneos en sueros con alto contenido de lípidos. Requiere de un polarímetro para su lectura, mientras el cELISA puede utilizar cualquier lector de uso habitual en los laboratorios clínicos <sup>62</sup>. Cuando se sospecha una infección por *Brucella canis*, el diagnóstico se realiza utilizando antígenos preparados con la cepa *B. canis* M<sup>+</sup>. La prueba de microaglutinación (RSAT) como tamiz y una ELISA indirecta (IELISA) como confirmatoria que utiliza una proteína recombinante como conjugado <sup>59</sup> han demostrado ser eficaces en el caso de infecciones por *B. canis*.

## **Bioseguridad**

El género *Brucella* es clasificado por el “Manual de Bioseguridad en el Laboratorio” de la OMS<sup>64</sup>, en el grupo de riesgo III. El peligro al manipularlo es alto para el operador, aunque escaso para la comunidad ya que no se transmite de un individuo a otro. En el laboratorio clínico las buenas prácticas incluyen medidas de

protección para el personal que manipula muestras de sangre, hemocultivos, biopsias, líquido cefalorraquídeo o material extraído de abscesos, desde donde habitualmente se intenta el aislamiento de *Brucella* spp.<sup>60</sup>. El riesgo principal lo constituyen los aerosoles que se generan en la mayoría de las operaciones de rutina, por eso se debe tratar de reducirlas al mínimo. El médico que deriva muestras al laboratorio debería advertir sobre la posibilidad de encontrar este germen aunque la enfermedad suele presentar síntomas diversos e inespecíficos y a veces no se sospecha<sup>88</sup>.

Se adquiere en el laboratorio con mucha frecuencia<sup>73</sup>, a veces porque quien intenta identificar el aislamiento lo confunde con otro microorganismo y trabaja sin protección o porque sospechando su presencia no dispone de facilidades<sup>93</sup>. La mayoría de los accidentes se deben a malas prácticas como oler los cultivos, trabajar en la mesada abierta, no usar equipo de protección personal o llevarse las manos contaminadas a la boca<sup>63, 65</sup>. Cuando se derrama una suspensión que contenga *Brucella* se debe evacuar el laboratorio y proceder a su desinfección utilizando un equipo adecuado. El área de trabajo debe contar con equipos de protección personal, cabinas de seguridad biológica y un Manual de Bioseguridad donde se detallen los procedimientos para cada laboratorio en particular, el uso apropiado de los desinfectantes, el mantenimiento de las instalaciones, el transporte del material biológico<sup>49</sup>, el control de acceso a visitantes e instrucciones para controlar emergencias.

## **Bioterrorismo**

Algunas características del género *Brucella* como el bajo costo que implica

producirlo en gran escala, su fácil dispersión en el aire, la capacidad de generar una enfermedad infecciosa prolongada y con probabilidades de dejar secuelas, han sido consideradas de interés para el desarrollo de armas biológicas <sup>44</sup>. Se ha estimado que una dispersión empleando aerosoles, en condiciones favorables, podría causar 82.500 casos de brucelosis y 413 muertes <sup>111</sup>.

Los microorganismos que pueden ser utilizados como arma biológica, han sido divididos en tres categorías (A, B y C) teniendo en cuenta su capacidad para transformarse en una amenaza para la Salud Pública y un riesgo para la seguridad nacional. El género *Brucella* pertenece a la categoría B: gérmenes que son moderadamente transmisibles, que presentan tasa de morbilidad moderada y baja tasa de mortalidad. Se recomienda a los laboratorios revisar regularmente las políticas y procedimientos de seguridad, controlar los accesos a refrigeradores y *freezers*, mantener siempre cerradas las puertas de laboratorios y bioterios, custodiar los armarios que contengan cepas, material químico o radiactivo, llevar un registro de los ingresos de las visitas, abrir los paquetes que ingresen en cabinas de seguridad biológica y acondicionar el material que sale de acuerdo a normas nacionales e internacionales de seguridad biológica.

## **Tratamiento**

El tratamiento de todas las formas de brucelosis humana se basa en la administración de antibióticos en la etapa más temprana posible bajo la supervisión médica, aún en los pacientes que demuestren una mejoría espontánea. Cuando la enfermedad presenta complicaciones, el tratamiento puede incluir la intervención quirúrgica. La forma aguda no complicada responde a la terapia y es posible la



recuperación clínica y bacteriológica. Algunos antimicrobianos que tienen actividad *in vitro* frente a especies de *Brucella* no siempre son clínicamente eficaces. Los pacientes tratados con  $\beta$ -lactámicos (penicilinas y cefalosporinas) o con macrólidos (eritromicina), han presentado recaídas en pacientes con brucelosis. Aunque los nuevos macrólidos, como la azitromicina y claritromicina son más activos *in vitro* que la eritromicina, no se ha demostrado que tengan mayor eficacia que los tratamientos actuales <sup>9, 28, 80, 97, 98, 99, 111</sup>.

## **Tratamiento de la brucelosis en adultos** <sup>45</sup>

### Primera alternativa

Doxiciclina en dosis de 100 mg cada 12 horas, por vía oral durante 6 semanas. Para evitar recaídas el tratamiento se asocia durante las primeras 2 o 3 semanas a un aminoglucósido como estreptomina en dosis de 1 g diario IM o rifampicina (600-900 mg/día por vía oral), durante 6 semanas dividida en 2 o 3 tomas diarias o gentamicina 5 mg/kg IM en monodosis durante 2 semanas.

### Segunda alternativa

Tetraciclina en dosis de 500 mg cada 6 horas por vía oral durante 6 semanas asociada a rifampicina (600-900 mg/día por vía oral), durante 6 semanas dividida en 2 o 3 tomas diarias o a estreptomina en dosis de 1 g diario IM durante 2-3 semanas.

## **Tratamiento de la brucelosis en niños mayores de 8 años<sup>45</sup>**

### Primera alternativa

Doxiciclina en dosis de 2-4 mg/kg/día por vía oral durante 6 semanas asociada a estreptomicina en dosis de 1 g diario IM durante 2 semanas o a gentamicina 3-5 mg/kg/día IM o IV cada 8 h durante 1 semana.

### Segunda alternativa

Doxiciclina en dosis de 2-4 mg/kg/día por vía oral durante 6 semanas asociada a rifampicina 15-20 mg/kg/día por vía oral, durante 6 semanas, cada 12 h.

## **Tratamiento de la brucelosis en niños menores de 8 años<sup>45</sup>**

Cotrimoxazol (trimetoprima-sulfametoxazol) 8 a 10 mg/kg/día c/12 h por vía oral, (máximo 480 mg de trimetoprima) durante 45 días, asociada a rifampicina 15 a 20 mg/kg/día por vía oral (máximo: 600-900 mg/día) durante 45 días.

## **Tratamiento de la brucelosis en embarazadas<sup>45</sup>**

Rifampicina 600 mg/día por vía oral durante 6 semanas sola o asociada a cotrimoxazol 160/800 (esta última solo si la paciente se encuentra entre la semana 13 y la 36 del embarazo).

Durante el embarazo es imprescindible hacer un análisis de riesgo-beneficio para definir la necesidad de tratamiento.

## **Tratamiento posexposición**

La mayoría de los accidentes ocurren en los laboratorios clínicos, de investigación o de producción de vacunas y antígenos. El tratamiento profiláctico depende del criterio médico. En general se recomienda una combinación oral de 100 mg de doxiciclina 2 veces por día con 300 mg de rifampicina 3 veces por día, durante 3 semanas. En casos de embarazo es recomendable evaluar la posibilidad de suministrar trimetoprima-sulfametoxazol 2 veces por día durante 3 semanas<sup>111</sup>.

## **Medidas preventivas**

- Alertar a la población de áreas rurales sobre el riesgo de contraer la enfermedad.
- Evitar el consumo de lácteos elaborados con leche no pasteurizada.
- Controlar la adecuada inmunización de los animales y revisar el manejo de los infectados.

### Control de expuestos al mismo riesgo

- Investigar los contactos y la fuente de infección.
- En caso de inoculación accidental, consultar al médico y realizar la notificación.

### Medidas en caso de brote o epidemia

- Examinar los casos potencialmente expuestos.
- Buscar la fuente común de infección.
- Coordinar con SENASA (local y regional) el control del ganado.
- Coordinar con bromatología local el control de alimentos contaminados.

### Medidas Internacionales

- Examinar los animales domésticos y los productos de origen animal destinados al transporte y comercio internacional.

## Bibliografía

1. Agostinelli DA, Sánchez de Bustamante J, Grendene A, Barbon SM, Ayala SM, Lucero NE. *Brucella suis* biovar 1 isolated from a hepatic abscess drainage. Vector Borne Zoonotic Dis. 2012; 12: 616-8.
2. Akcacus M, Esel D, Cetin N, Kisaarslan AP, Kurtoglu S. *Brucella melitensis* in blood culture of two newborns due to exchange transfusion. Turk J Pediatr. 2005; 47: 272-4.
3. Akritidis N, Tzivras M, Delladetsima I, Stefanaki S, Moutsopoulos HM, Pappas G. The liver in brucellosis. Clin Gastroenterol Hepatol. 2007; 5: 1109-12.
4. Al Dahouk S, Nöckler K. Implications of laboratory diagnosis on brucellosis therapy. Expert Rev Anti Infect Ther. 2011; 9: 833-45.
5. Almirón M, Martínez M, Sanjuan N, Ugalde RA. Ferrochelatase is present in *Brucella abortus* and is critical for its intracellular survival and virulence. Infect Immun. 2001; 69:6225-30.
6. Almirón MA, Roset MS, Sanjuan N. The aggregation of *Brucella abortus* occurs under microaerobic conditions and promotes desiccation tolerance and biofilm formation. Open Microbiol J. 2013;7:87-91.
7. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Bacteriological and serological methods. En : Techniques for the Brucellosis Laboratory. Paris, Institut National de la Recherche Agronomique, 1988.
8. Alva-Pérez J, Arellano-Reynoso B, Hernández-Castro R, Suárez-Guemes F. The *invA* gene of *Brucella melitensis* is involved in intracellular invasion and is required to establish infection in a mouse model. Virulence. 2014; 5:563-74.
9. Ariza J, Bosilkovski M, Cascio A, Colmenero JD, Corbel MJ, Falagas ME, Memish ZA, Roushan MR, Rubinstein E, Sipsas NV, Solera J, Young EJ, Pappas G. Perspectives for the treatment of brucellosis in the 21st century: the Ioannina recommendations. International Society of Chemotherapy; Institute of Continuing Medical Education of Ioannina. PLoS Med. 2007;4:e317.
10. Ariza J, Pigrau C, Cañas C, Marrón A, Martínez F, Almirante B, Corredoira JM, Casanova A, Fabregat J, Pahissa A. Current understanding and management of chronic hepatosplenic suppurative brucellosis. Clin Infect Dis. 2001; 32:1024-33.
11. Baily GG, Kranhn JB, Drasar BS, Stoker NG. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. J Trop Med Hyg. 1992; 95:271-5.
12. Barbier T, Nicolas C, Letesson JJ. *Brucella* adaptation and survival at the crossroad of metabolism and virulence. FEBS Letters. 2011; 585:2929-34.
13. Blair Hedges S, Kumar S. Genomic clocks and evolutionary timescales. Trends Genet. 2003; 19: 200-6.
14. Bosilkovsky M, Krteva L, Caparoska S, Dimzova M. Hip arthritis in brucellosis: a study of 33 cases in the Republic of Macedonia (FYROM). Int J Clin Pract. 2004; 58:1023-7.
15. Bounaadja L, Albert D, Chénais B, Hénault S, Zygmunt MS, Poliak S, Garin-Bastuji B. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: a comparative study of *IS711*, *bcsp31* and *per* target genes. Vet Microbiol. 2009; 137:156-64.

16. Bricker BJ, Ewalt DR. Evaluation of the HOOF-print assay for typing *Brucella abortus* strains isolated from cattle in the United States: Results with four performance criteria. *BMC Microbiol.* 2005; 5: 37.
17. Bricker BJ, Ewalt DR, Halling SM. *Brucella* "HOOF-prints": Strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). *BMC Microbiol.* 2003; 3:15.
18. Bricker BJ. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol.* 2002; 90: 435-46.
19. Byndloss MX, Tsolis RM. *Brucella* spp. Virulence factors and immunity. *Annu Rev Anim Biosci.* 2016; 4:111-27.
20. Cacace ML, Claros EA, Erazu KA, Escobar GI, Lucero NE. Congenital brucellosis in infant. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013;13:513-5.
21. Carmichael LE, Bruner DW. Characteristic of a newly recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortion. *Cornell Vet.* 1968; 58: 579-92.
22. Castañeda-Roldán EI, Avelino-Flores F, Dall'Agnol, Freer E, Cedillo L, Dornand J, Girón JA. Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. *Cell Microbiol.* 2004; 6:435-45.
23. Castañeda-Roldán EI, Quahrani-Bettache S, Saldaña Z, Avelino F, Rendón MA, Dornand J, Girón JA. Characterization of SP41, a surface protein of *Brucella* associated with adherence and invasion of host epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2006; 8: 1877-87.
24. Cha SB, Rayamajhi N, Lee WJ, Shin MK, Jung MH, S SW, Kim JW, Yoo HS. Generation and envelope protein analysis of internalization defective *Brucella abortus* mutants in professional phagocytes, RAW 264.7. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012; 64: 244-54.
25. Cloeckert A, Verger JM, Grayon M, Paquet JY, Garin-Bastuji B, Foster G, Godfroid J. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. *Microbes Infect.* 2001; 3: 729-38.
26. Corbel MJ, Thomas EL. Use of phage for the identification of *Brucella canis* and *Brucella ovis* cultures. *Res Vet Sci.* 1985; 35: 35-40.
27. Corbel MJ, Banai M. Genus *Brucella*, Meyer and Shaw 1920, 173AL En: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* New York: Springer, 2005, vol. 2, p. 370-86.
28. Corbel MJ. Brucellosis in humans and animals. FAO/OIE/WHO, 2006. WHO/CDS/EPR/2006.7.
29. De BK, Stauffer L, Koylass MS, Sharp SE, Gee JE, Helsel IO, Steigerwalt AG, Vega R, Clark TA, Dasneshvar MI, Wilkins PP, Whatmore AM. Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *J Clin Microbiol.* 2008; 46 : 43-9.
30. Del Vecchio VG, Kapatral V, Elzer P, Patra G, Mujer CV. The genome of *Brucella melitensis*. *Vet Microbiol.* 2002; 90: 587-92.
31. Delrue RM, Lestrade P, Tibor A, Letesson JJ, De Bolle X. *Brucella* pathogenesis, genes identified from random lage-scale screens. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 231:1-12.
32. Del Vecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Los T, Ivanova N, Anderson I, Bhattacharyya A, Lykidis A, Reznik G, Jablonski L, Larsen N, D'Souza M, Bernal A, Mazur M, Goltsman E, Selkov E, Elzer PH, Hagius S, O'Callaghan D, Letesson JJ, Haselkorn R, Kyrpidis

- N, Overbeek R. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99: 443–8.
33. Demiroğlu YZ, Turunç T, Karaca S, Arlier Z, Alışkan H, Colakoğlu S, Arslan H. Neurological involvement in brucellosis; clinical classification, treatment and results. Mikrobiyol Bul. 2011; 45:401-10.
  34. Ertem M, Kurekci AE, Aysev D, Unal E, İkinciogullari A. Brucellosis transmitted by bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant. 2000; 26 :225-6.
  35. Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Sanborn MR. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. J Appl Bacteriol. 1990; 69:216–27.
  36. Fitch T. *Brucella* taxonomy and evolution. Future Microbiol. 2010; 5: 859-66.
  37. Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckert A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp.nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. Int J Syst Evol Microbiol. 2007; 57: 2688-93.
  38. Foster JT, Beckstrom-Sternberg SM, Pearson T, Beckstrom-Sternberg JS, Chain PS, Roberto FF, Hnath J, Brettin T, Keim P. Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus *Brucella*. J Bacteriol. 2009;191: 2864-70.
  39. Garcia Carrillo C. La brucelosis de los animales en América y su relación con la infección humana. OIE, Paris, 1987, 303 pág.
  40. García-Yoldi D, Marín CM, de Miguel MJ, Muñoz PM, Vizmanos JL, López-Goñi I. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. Clin Chem. 2006; 52: 779-81.
  41. Garin-Bastuji B, Mick V, Le Carrou G, Allix S, Perrett LL, Dawson CE, Groussaud P, Stubberfield EJ, Koylass M, Whatmore AM. Examination of taxonomic uncertainties surrounding *Brucella abortus* bv. 7 by phenotypic and molecular approaches. Appl Environ Microbiol. 2014; 80:1570-9.
  42. Gazapo E, González Lahoz J, Subiza JL, Baquero M, Gil J, de la Concha EG. Changes in IgM and IgG antibody concentrations in brucellosis over time: importance for diagnosis and follow up. J Infect Dis. 1989; 159: 219-25.
  43. Gorvel JP. *Brucella*: a Mr “Hide” converted into Dr Jeckill. Microbes Infect. 2008; 10: 1010-3.
  44. Greenfield RA, Drevets DA, Machado LJ, Voskuhl GW, Cornea P, Bronze MS. Bacterial pathogens as biological weapons and agents of bioterrorism. Am J Med Sci. 2002; 323: 299-315.
  45. Guía para el equipo de salud, N° 12, Brucelosis, Ministerio de Salud, Argentina, 2013.
  46. Gwida M, Al Dahouk S, Melzer F, Rösler U, Neubauer H, Tomaso H. Brucellosis - regionally emerging zoonotic disease? Croat Med J. 2010; 51:289-95.
  47. Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Qing Z, Li LL, Kapur V, Alt DP, Olsen SC. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. J Bacteriol. 2005;187: 2715–26.

48. Herman L, De Ridder H. Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 1992; 58: 2099–101.
49. IATA. Dangerous Goods Regulations, 53<sup>th</sup> edition, 2012.
50. Isayama Y, Azuma R, Tanaka S, Suto T. The pathogenicity and antigenicity of "*Brucella canis*" strain QE13 for experimental animals. *Ann Sclavo.* 1977;19:89-98.
51. Khan MY, Mah MW, Memish ZA. Brucellosis in pregnant women. *Clin Infect Dis.* 2001; 32: 1172-7.
52. Ko Ky, Kim JW, Her M, Kang SI, Jung SC, Cho DH, Kim JY. *Immunogenic proteins of Brucella abortus* to minimize cross reactions in brucellosis diagnosis. *Vet Microbiol.* 2012; 156:374-80.
53. Lacerda TL, Salcedo SP, Gorvel JP. *Brucella* T4SS: the VIP pass inside host cells. *Curr Opin Microbiol.* 2013;16:45-51.
54. Le Flèche P, Jacques I, Grayon M, Al Dahouk S, Bouchon P, France Denoeud F, Nöckler K, Neubauer H, Guilloteau LA, Vergnaud G. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* 2006; 6: 9.
55. Leal-Klevezas DS, Martínez-Vázquez IO, López-Merino A, Martínez-Soriano JP. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 3087-90.
56. Li Z, Fu Q, Wang Z, Li T, Zhang H, Guo F, Wang Y, Zhang J, Chen C. TceSR two-component regulatory system of *Brucella melitensis* 16M is involved in invasion, intracellular survival and regulated cytotoxicity for macrophages. *Lett Appl Microbiol.* 2015; 60:565-71.
57. Lim KB, Kwak YG, Kim DY, Kim YS, Kim JA. Back pain secondary to *Brucella* spondylitis in the lumbar region. *Ann Rehabil Med.* 2012; 36:282-6.
58. Lucero NE, Ayala SM, Escobar GI, Grayon M, Jacques I. A new variant of *Brucella melitensis*. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12: 593-6.
59. Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Jacob N. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *J Med Microbiol.* 2005; 54: 457-61.
60. Lucero NE, Siñeriz F. The Argentine experience in enhancing biosafety through good laboratory practices. *Asian Biotechnol Dev Rev.* 2005; 8: 99-120.
61. Lucero NE, Ayala SM, Escobar G, Jacob NR. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiol Infect.* 2008; 136:496-503.
62. Lucero NE, Ayala SM, Escobar GI, Jacob NR. The value of serologic tests for diagnosis and follow up of patients having brucellosis. *Am J Infect Dis.* 2007; 3:27-35.
63. Maley MW, Kociuba K, Chan RC. Prevention of laboratory- acquired brucellosis: significant side effects of prophylaxis. *Clin Infect Dis.* 2006; 42: 433-4.
64. Manual de bioseguridad en el laboratorio. OMS, Ginebra, 2005.
65. Marianelli C, Petrucca A, Pasquali P, Ciuchini F, Papadopoulou S, Cipriani P. Use of MLVA-16 typing to trace the source of a laboratory-acquired *Brucella* infection. *J Hosp Infect.* 2008; 68: 274-6



66. Marrodan T, Nenova-Poliakova R, Rubio M, Ariza J, Clavijo E, Smits HL, Diaz R. Evaluation of three methods to measure anti-*Brucella* IgM antibodies and interference of IgA in the interpretation of mercaptan-based tests. *J Med Microbiol.* 2001; 50:663-6.
67. Marzetti S, Carranza C, Roncallo M, Escobar GI, Lucero NE. Recent trends in human *Brucella canis* infection. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2012 Oct 4. doi:pii: S0147-9571(12)00102-6. 10.1016/j.cimid.2012.09.002.
68. Meltzer E, Sidi Y, Smolen G, Banai M, Bardenstein S, Schwartz E. Sexually transmitted brucellosis in humans. *Clin Infect Dis.* 2010; 51:e12-5.
69. Moreno E, Cloeckeaert A, Moriyon I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol.* 2002; 90: 209-27.
70. Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, Mayer H. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J Bacteriol.* 1990; 171: 3569-76.
71. Navarro E, Casao MA, Solera J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Rev Mol .* 2004; 4: 115-123.
72. Navarro-Martínez A, Solera J, Corredoira J, Beato JL, Martínez-Alfaro E, Atiénzar M, Ariza J. Epididymo-orchitis due to *Brucella melitensis*: a retrospective study of 59 patients. *Clin Infect Dis.* 2001; 33: 2017-22.
73. Noviello S, Gallo R, Kelly M, Limberger RJ, De Angelis K, Cain L, Wallace B, Dumas N. Laboratory-acquired brucellosis. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10: 1848-50.
74. OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Identification of the agent. In: (Chapter 2.4.3). Office International des Epizooties, 5th ed. Paris, 2009.
75. Ouahrani S, Michaux S, Sri Widada J, Bourg G, Tournebize R, Ramuz M, Liautard JP. Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella* spp.: Relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. *J Gen Microbiol.* 1993; 139: 3265-73.,
76. Palanduz A, Palanduz S, Guler K, Guler N. Brucellosis in a mother and her young infant: probable transmission by breast milk. *Int J Inf Dis.* 2000; 4: 55-6.
77. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. Brucellosis. *N Engl J Med.* 2005; 352:2325-36.
78. Pappas G, Bosilkovsky M, Akritidis N, Mastora M, Krteva L, Tsianos E. Brucellosis and the respiratory system. *Clin Infect Dis.* 2003; 37: e95-9.
79. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis.* 2006; 6:91–9.
80. Pappas G, Seitaridis S, Akritidis N, Tsianos E. Treatment of brucella spondylitis: lessons from an impossible meta-analysis and initial report of efficacy of a fluoroquinolone-containing regimen. *Int J Antimicrob Agents.* 2004; 24:502-7.
81. Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, Read TD, Dodson RJ, Umayam L, Brinkac LM, Beanan MJ, Daugherty SC, Deboy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Nelson WC, Ayodeji B, Kraul M, Shetty J, Malek J, Van Aken SE, Riedmuller S, Gill RS, Tettelin H, Gill SR, White O, Salzberg SL, Hoover DL, Lindler LE, Halling SM, Boyle SM, Fraser CM.

- The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99:13148–53.
82. Pei J, Kahl-McDonagh M, Ficht TA. *Brucella* dissociation is essential for macrophage egress and bacterial dissemination. Front Cell Infect Microbiol. 2014;4:23.
  83. Perry QL, Hagius SD, Walker JV, Elzer PH. Evaluating the virulence of a *Brucella melitensis* hemagglutinin gene in the caprine model. Vaccine. 2010;28 Suppl 5:F6-11.
  84. Queipo-Ortuño MI, Tena F, Colmenero JD, Morata PV. Comparison of seven commercial DNA extraction kits for the recovery of *Brucella* DNA from spiked human serum samples using real-time PCR. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008; 27:109-14.
  85. Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Reguera JM, Garcia-Ordoñez MA, Pachon ME, Gonzalez M, Morata P. Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. Clin Microbiol Infect. 2005; 11: 713-8.
  86. Redkar R, Rose S, Bricker B, Del Vecchio V. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. Mol Cell Probes. 2001; 15: 43-52.
  87. Romero C, Gamazo C, Pardo M, Lopez Goñi I. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. J Clin Microbiol. 1995; 3: 615-7.
  88. Robichaud S, Libman M, Behr M, Rubin E. Prevention of laboratory-acquired brucellosis. Clin Infect Dis. 2004; 38: 119-22.
  89. Rood RM, Gaines JM, Anderson ES, Caswell CC, Martin DW. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. Med Microbiol Immunol. 2009; 198: 221-38.
  90. Roset MS, Almiron MA. FixL-like sensor FlbS of *Brucella abortus* binds haem and is necessary for survival within eukaryotic cells. FEBS letters. 2013;587:3102-7.
  91. Samartino LE. Brucellosis in Argentina. Vet Microbiol. 2002; 90: 71-80.
  92. Sasmazel A, Baysal A, Fedakar A, Bugra O, Özkokeli M, Büyükbayrak F, Keles C, Göçer S, Sunar H, Zeybek R. Treatment of *Brucella endocarditis*: 15 years of clinical and surgical experience. Ann Thorac Surg. 2010; 89:1432-6.
  93. Sayin-Kutlu S, Kutlu M, Ergonul O, Akalin S, Guven T, Demiroglu YZ, Acicbe O, Akova M. Laboratory-acquired brucellosis in Turkey. Occupational Infectious Diseases Study Group. J Hosp Infect. 2012; 80:326-30.
  94. Scholz HC, Hubalek Z, Nesvadbova J, Tomaso H, Vergnaud G, Le Flèche P, Whatmore AM, Al Dahouk S, Krüger M, Lodri C, Pfeffer M. Isolation of *Brucella microti* from soil. Emerg Infect Dis. 2008; 14: 1316-7.
  95. Scholz HC<sup>1</sup>, Hubalek Z, Sedláček I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Melzer F, Kämpfer P, Neubauer H, Cloeckert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Falsen E, Bahn P, Göllner C, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, Nöckler K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. Int J Syst Evol Microbiol. 2008; 58(Pt 2):375-82.
  96. Shemesh AA, Yagupsky P. Isolation rates of *Brucella melitensis* in an endemic area and implications for laboratory safety. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012; 31: 441-3.

97. Solera J, Geijo P, Largo J, Rodriguez-Zapata M, Gijón J, Martinez-Alfaro E, Navarro E, Macia MA. A randomized, double-blind study to assess the optimal duration of doxycycline treatment for human brucellosis. *Clin Infect Dis*. 2004; 39:1776-82.
98. Solera J. Update on brucellosis: therapeutic challenges. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 36 Suppl 1:S18-20.
99. Solís García del Pozo J, Solera J. Systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials in the treatment of human brucellosis. *PLoS One*. 2012; 7:e32090.
100. Starr T, Child R, Wehrty TD, Hansen B, Hwang S, López-Otin C, Virgin HW, Celli J. Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle. *Cell Host Microbes*. 2012; 11:33-45.
101. Tiller RV, Gee JE, Lonsway DR, Gribble S, Bell SC, Jennison AV, Bates J, Coulter C, Hoffmaster AR, De BK. Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. *BMC Microbiology*. 2010; 10:23.
102. van Belkum A. High-throughput epidemiologic typing in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect*. 2003; 9: 86-100.
103. Verger JM, Grimont F, Grimont PAD, Grayon M. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int J Syst Bacteriol*. 1985; 35: 292-5.
104. Viada C, Rodriguez MC, Sangari FJ, Gorvel JP, García-Lobo JM, Lopez-Goñi I. Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS two-component regulatory system. *PLoS One*. 2010; 5:e10216.
105. Vitry MA, Hanot Mambres D, Deghelt M, Hack K, Machelart A, Lhomme F, Vanderwinden JM, Vermeersch M, De Trez C, Pérez-Morga D, Letesson JJ, Muraille E. *Brucella melitensis* invades murine erythrocytes during infection. *Infect Immun*. 2014;82:3927-38.
106. von Barge K, Gorvel JP, Salcedo SP. Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiol Rev*. 2012; 36: 533-62.
107. Watanabe K, Kim S, Nishiguchi M, Suzuki H, Watarai M. *Brucella melitensis* infection associated with Guillain-Barré syndrome through molecular mimicry of host structures. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005; 45:121-7.
108. Whatmore AM. Current understanding of the genetics diversity of *Brucella* an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infect Genet Evol*. 2009; 9:1168–84.
109. Whatmore AM, Shankster SJ, Perret L, Murphy TJ, Brew SD, Thirlwall RE, Cutler SJ, MacMillan AP. Identification and characterization of variable-number of tandem-repeat markers for typing of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 1982-93.
110. Yagupsky P, Nechama Peled, Press J. Use of Bactec 9240 blood culture system for detection of *Brucella melitensis* in synovial fluid. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 738-9.
111. Yagupsky P, Baron Ellen Jo. Laboratory exposure to brucellae and implications for bioterrorism. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11: 1180-5.
112. Yang, S, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis*. 2004; 4:337-48.
113. Young EJ. An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis*. 1995; 21: 283-9; quiz 290.

114. Yu WL, Nielsen K. Review of detection of *Brucella* spp. by polymerase chain reaction. Croat Med J. 2010; 51: 306-13.
115. Zhang Z, Kermekchiev MB, Barnes WM. Direct DNA amplification from crude clinical samples using a PCR enhancer cocktail and novel mutants of Taq. J Mol Diagn. 2010; 12:152-61.

## **Capítulo II.c.4.5**

### **Género *Helicobacter***

#### **HERIBERTO FERNÁNDEZ**

Instituto de Microbiología Clínica  
Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile.

#### **MYRA WILSON**

Instituto de Microbiología Clínica  
Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile.

#### **LAURA OTTH**

Instituto de Microbiología Clínica  
Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile.

#### **CLAUDIO TOLEDO**

Instituto de Medicina.  
Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile.

## Introducción

El aislamiento y descripción de *Helicobacter pylori* por Marshall y Warren en los primeros años de la década de los 80<sup>67,64</sup>, hizo que recobrara importancia la bacteriología gástrica y su relación con procesos patológicos. De esta manera se confirmó la teoría infecciosa para la etiología de la úlcera gástrica formulada hace más de un siglo por Lebert y Cohn<sup>60</sup>. Por otra parte, el aislamiento de otras especies de *Helicobacter* a partir de mucosa gástrica de mamíferos<sup>24</sup> permitió confirmar, también, las observaciones y descripciones de bacterias morfológicamente semejantes, localizadas a nivel del epitelio gástrico de animales que fueron realizadas a fines del siglo pasado<sup>32</sup>.

La asociación demostrada entre la presencia de *H. pylori* y el desarrollo de gastritis y úlcera péptica en el ser humano, como asimismo el aislamiento de bacterias de características similares a partir de animales, permitieron postular un nuevo enfoque de la etiopatogenia de estos cuadros. Sin embargo, inicialmente este enfoque fue motivo de controversia y escepticismo. El hecho de aceptar el rol de una bacteria, hasta entonces desconocida, en la patogénesis de estas entidades clínicas representaba modificar no solo una concepción tradicional de su fisiopatología<sup>25</sup>, sino también el conocimiento acumulado en relación a la ecología y distribución de la microbiota del tracto gastrointestinal<sup>16</sup>.

Actualmente el género *Helicobacter* es considerado un taxón de gran importancia con especies que se aíslan del tracto gastrointestinal y hepatobiliar de un gran número de mamíferos, incluido el ser humano, así como de aves domésticas y silvestres<sup>20,31</sup>. *Helicobacter pylori* es su especie tipo y, a la vez,

es responsable de la infección bacteriana crónica más común en el mundo, estimándose que su prevalencia global está por sobre el 50%.

## Aspectos taxonómicos

El género *Helicobacter* (del griego: *helix*, helicoidal; *bacter*, bacteria) pertenece al reino Bacteria, *phylum* Protobacteria, clase Epsilonproteobacteria, orden Campylobacterales, familia *Helicobacteraceae*, la cual incluye los géneros *Helicobacter*, *Sulfuricurvum*, *Sulfurimonas*, *Sulfurovum*, *Thiovulum* y *Wolinella*.

Las especies del género *Helicobacter* corresponden a bacilos gram negativos curvos o helicoidales de 0,3 – 1 µm de diámetro y 1,5 – 5 µm de longitud que, en cultivos viejos, pueden transformarse en cuerpos esféricos o cocoides. Son móviles por flagelación polar monótrica o lofótrica. En la mayoría de las especies, los flagelos están revestidos por una delgada envoltura y algunas especies presentan un bulbo terminal en estos apéndices. Son microaerófilos, no utilizan los hidratos de carbono y la temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C para la mayoría de las especies descritas. Inicialmente, por su semejanza morfológica, las especies de este género inicialmente fueron incluidas en el género *Campylobacter*. Sin embargo estudios de taxonomía molecular mediante secuenciación del ARN ribosómico y de hibridación ADN-ARNr, además de estudios ultraestructurales, de composición de ácidos grasos, de sus menaquinonas respiratorias y de sus capacidades enzimáticas, demostraron que estas bacterias presentaban una

posición filogenética diferente de las especies de *Campylobacter*, lo que permitió la creación del género *Helicobacter* en 1989<sup>24, 27, 31, 40, 64, 65</sup>.

En la actualidad, en el género *Helicobacter* se reconocen oficialmente 33 especies<sup>18</sup>. Sin embargo, la revisión de la literatura ha permitido establecer que han sido descritas cinco especies más y, en el futuro, podría estar constituido por 38 especies, algunas de los cuales se han aislado del ser humano y otras de diversos animales. En la Tabla 1 se indica la relación de estas especies, con su respectiva fuente de aislamiento inicial<sup>20, 31</sup>.

En relación a su hábitat o lugar inicial de colonización, las especies de *Helicobacter* pueden ser separadas en dos grandes grupos: aquellas que colonizan la mucosa gástrica (*Helicobacter* gástricos) y aquellas cuyo hábitat preferencial lo constituye la mucosa intestinal y/o las vías biliares (*Helicobacter* enterohepáticos)<sup>52</sup>. Otros, dividen estas especies en 3 grupos, a saber: grupo gástrico, grupo enterohepático y grupo de flagelos no envainados<sup>31</sup>. A los efectos de este capítulo y por considerar que algunas especies del tercer grupo tienen cierta significación clínica, mantendremos en la Tabla 1 la separación inicial en los dos primeros grupos, indicando cuales de ellas presentan flagelos no envainados.

De las 38 especies descritas hasta ahora en la literatura, solo tres han sido aisladas exclusivamente del hombre (*H. fennelliae*, *H. westmeadii* y *H. winghamensis*), 21 se aislaron únicamente de diversas especies animales y 14 presentaban potencial para infectar tanto al hombre como a los animales. Dentro de estas 14 se encuentra *H. pylori* que, si bien su rol patógeno para el ser humano está fehacientemente establecido, su eventual carácter zoonótico se encuentra en discusión<sup>20, 46</sup>.



**Tabla 1.** Especies del género *Helicobacter* descritas en la literatura

Especie de <i>Helicobacter</i> según grupo	Hospedero primario	Hábitat	Enfermedad en el humano
<b>Grupo gástrico</b>			
<i>H. acinonichis</i>	Felinos (chitas)	Epitelio gástrico	No descrita
<i>H. baculiformis</i>	Gato	Epitelio gástrico	No descrita
<i>H. bizzozeroni</i>	Perro, gato	Epitelio gástrico	Gastritis, úlcera
<i>H. bovis</i> <sup>a</sup>	Bovinos	Epitelio gástrico	Gastritis
<i>H. cetorum</i>	Delfin, ballena	Epitelio gástrico	No descrita
<i>H. cyanogastricus</i>	Perro	Epitelio gástrico	No descrita
<i>H. felis</i>	Gato, perro	Epitelio gástrico	Gastritis, úlcera
<i>H. heilmanii</i> <sup>a</sup>	Hombre	Epitelio gástrico	Gastritis, úlcera
<i>H. mustelae</i>	Hurón	Epitelio gástrico	No descrita
<i>H. pylori</i>	Hombre	Epitelio gástrico	Gastritis, úlcera, linfoma MALT, cáncer gástrico
<i>H. salomonis</i>	Perro	Epitelio gástrico	Gastritis, úlcera
<i>H. suis</i>	Cerdo	Epitelio gástrico	Gastritis, úlcera
<i>H. suncus</i>	Musaraña	Epitelio gástrico	No descrita
<b>Grupo enterohepático</b>			
<i>H. anseris</i>	Ganso	Intestino	No descrita
<i>H. aurati</i>	Hamster	Intestino	No descrita
<i>H. bilis</i>	Roedores, perro	Intestino, hígado	Sepsis
<i>H. brantae</i>	Ganso	Intestino	No descrita
<i>H. canis</i>	Perro	Intestino	No descrita
<i>H. canadenses</i> <sup>b</sup>	Pollo, ganso	Intestino	Gastroenteritis
<i>H. cholecystus</i>	Hamster	Intestino, hígado	No descrita
<i>H. cinaedi</i>	Roedores, perro, primates	Intestino	Colitis, sepsis, celulitis
<i>H. equorum</i>	Caballo	Intestino	No descrita
<i>H. fennelliae</i>	Perro	Intestino	Colitis, sepsis
<i>H. ganmani</i> <sup>b</sup>	Ratones de laboratorio	Intestino	Hepatitis?
<i>H. hepaticus</i>	Roedores	Intestino, hígado	Colecistitis
<i>H. marmotae</i>	Marmota, gato	Intestino, hígado	No descrita
<i>H. mastomyrus</i>	Ratón ( <i>Mastomys</i> )	Intestino, hígado	No descrita
<i>H. mesocricetorum</i> <sup>b</sup>	Hamster	Intestino	No descrita
<i>H. magdeburgensis</i>	Ratones de laboratorio	Intestino	No descrita
<i>H. muridarum</i>	Roedores	Intestino	No descrita
<i>H. pametensis</i>	Aves silvestres, cerdo	Intestino	No descrita
<i>H. pullorum</i> <sup>b</sup>	Pollo, gallina	Intestino	Gastroenteritis
<i>H. rappini</i>	Ratón, ovino, perro	Intestino	Gastroenteritis, colecistitis
<i>H. rodentium</i> <sup>b</sup>	Roedores	Intestino	No descrita
<i>H. trogontum</i>	Roedores	Intestino	No descrita
<i>H. typhlonicus</i>	Roedores	Intestino	No descrita
<i>H. westmeadii</i>	Desconocido	Desconocido	Sepsis
<i>H. winghamensis</i> <sup>b</sup>	Roedores	Intestino	Gastroenteritis

<sup>a</sup>*Candidatus*, <sup>b</sup>flagelos no envainados

*H. pylori*, además de ser la especie tipo del género, se encuentra colonizando o infectando más del 50% de la población mundial y es el agente de la infección bacteriana crónica más frecuente en humanos<sup>19, 59</sup>. Por ello, en este capítulo se considera exclusivamente el análisis descriptivo de esta especie.

## ***Helicobacter pylori***

### **Morfología microscópica**

*H. pylori* es una bacteria gram negativa, curva, espiriforme o helicoidal, que mide de 2 a 3 µm de longitud por 0,5 a 1 µm de ancho. Es móvil, por poseer en uno de sus extremos, un mechón de 2 a 8 flagelos que le confieren gran movilidad. Los flagelos terminan en una estructura bulbar y se encuentran cubiertos por una membrana o vaina que los protege del efecto deletéreo del ácido gástrico. La forma espiralada es más evidente cuando se observa en el examen directo de las biopsias. Cuando se observa a partir de los cultivos, la morfología es más recta y se aprecian bacterias que han perdido sus flagelos. No forman esporas pero, en cultivos viejos o bajo condiciones de crecimiento o ambientales subóptimas, pueden transformarse en cuerpos esféricos o cocoides, los cuales no son cultivables. Estas formas se observan tanto *in vitro* como *in vivo* y no tienen la capacidad de adherirse a las células epiteliales ni de inducir la producción de interleuquina 8<sup>31,51,67</sup>.

## **Características culturales**

Como todos los integrantes del género, *H. pylori* es una bacteria quimiorganotrófica, asacarolítica y microerófila, con metabolismo respiratorio.

Es una bacteria de crecimiento lento y con cierta exigencia en cuanto a sus nutrientes. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C y, además de un pH cercano a 7, en los medios de cultivo requiere de una atmósfera microaeróbica y el suplemento de suero o sangre para crecer. Se puede adicionar suplementos como  $\beta$ -ciclodextrinas, IsoVitaleX<sup>®</sup> o carbón activado, los cuales pueden actuar como fuentes adicionales de nutrientes o de protección de los efectos tóxicos de los ácidos grasos de cadena larga. Para facilitar su aislamiento se puede agregar mezclas antibióticas que inhiban la microbiota acompañante. El cultivo en medios sólidos da origen a colonias pequeñas, no mayores de 1 mm de diámetro, transparentes y que, a veces, pueden presentar hemólisis <sup>1, 6, 20, 31, 67</sup>.

## **Factores de virulencia**

*H. pylori* origina una fuerte respuesta inmune, humoral y celular en la mucosa gástrica la cual, sin embargo, no consigue eliminar la infección. La existencia de infección sintomática o asintomática se explica por el polimorfismo inmune del hospedero, la presencia del medio ácido gástrico y la capacidad de *H. pylori* para colonizar un micronicho hostil como es el epitelio gástrico. La diferente expresión de virulencia de las cepas infectantes y la relación parásito-hospedero resultante involucran aspectos genéticos, microbiológicos, inmunológicos, bioquímicos y clínicos lo cual deja claro que,

para que se manifieste la patogenicidad y luego la enfermedad como complicación de la infección por *H. pylori*, deben interactuar factores bacterianos y factores del hospedero infectado. En efecto, la información genética contenida en el genoma de la bacteria le confiere a *H. pylori* la capacidad de colonizar, evadir y modular la respuesta inmune del hospedero, alterar la expresión de ciertos genes en las células del epitelio, sobrevivir y adaptarse al medio gástrico. El ADN de *H. pylori* está constituido por 1,65 millones de pares de bases que codifican alrededor de 1.500 proteínas, pero este genoma cambia constantemente debido a la activación y supresión de genes mediante un proceso de mutagénesis e incorporación de pequeños fragmentos de ADN foráneo proveniente de otras cepas de *H. pylori*. Algunos de estos genes variables codifican enzimas que modifican la estructura antigénica de las moléculas de su superficie, controlan la entrada de ADN foráneo y regulan la movilidad bacteriana. Tras la colonización, libera sustancias tóxicas que estimulan la respuesta inmunológica local en la que participan fundamentalmente los neutrófilos. Posteriormente se produce una amplificación de la respuesta inflamatoria por la interacción de linfocitos, neutrófilos, macrófagos, células mastoides y células no inmunes que liberan gran cantidad de mediadores químicos con lo que generan el daño en el epitelio gástrico <sup>2, 7, 29, 31, 46</sup>.

## Factores que contribuyen a la colonización de la mucosa gástrica

### Ureasa

Esta enzima genera amonio y CO<sub>2</sub> a partir de la hidrólisis de la urea, neutraliza el ácido gástrico y eleva el pH a 6 o 7, lo que le permite a la bacteria rodearse de un medio alcalino y protegerse del efecto nocivo de la secreción gástrica ácida hasta que logra su ubicación entre la superficie celular y la capa de moco que la recubre. Además, la ureasa tiene propiedades citotóxicas y, junto al amonio, lesiona la mucosa del epitelio gástrico, lo que permite la adherencia de la bacteria, la obtención de nutrientes y su posterior desarrollo. Esta enzima también es capaz de estimular la respuesta humoral específica, la quimiotaxis de monocitos y de neutrófilos y de activar las funciones de los macrófagos <sup>1, 10, 14, 43, 44, 46</sup>.

### Sistemas antioxidantes

*H. pylori* es una bacteria microaerófila sensible al efecto tóxico del O<sub>2</sub>. La detoxificación de los metabolitos se produce a través de diversos sistemas enzimáticos que posee la bacteria, como superóxido dismutasa, catalasa o peroxidasa, peroxirredoxinas y peroxinitrito, entre otros <sup>1, 14, 31</sup>.

## Flagelos

La gran movilidad de esta bacteria es un factor fundamental en la colonización de la mucosa gástrica, pues le permite atravesar la capa mucosa y contrarrestar el peristaltismo gástrico para poder adherirse a la superficie epitelial. Cada flagelo está compuesto por 2 flagelinas FlaA y FlaB, codificadas por los genes *flaA* y *flaB* respectivamente. FlaB se ubica en la base del flagelo y FlaA se encuentra en el exterior. La pérdida de las flagelinas da como resultado la pérdida de la movilidad, pero no de la capacidad de adherencia <sup>1</sup>,

10, 14, 31, 46, 68

## Adhesinas

La adherencia a la mucosa gástrica se verifica a través de varias adhesinas que utilizan receptores distintos, como son los glicerofosfolípidos, los sulfátidos, componentes de la matriz extracelular y secuencias repetidas de N-acetil-lactosamina. Entre las adhesinas, se destacan HpaA, BabA, SabA y OipA

1, 31, 46

## Factores que contribuyen al daño de la mucosa gástrica

### *VacA (vacuolating cytotoxin)*

Esta proteína, codificada por el gen *vacA*, induce la vacuolización en las células epiteliales, la muerte celular y la destrucción de la integridad epitelial. El gen posee regiones variables como la región señal, que puede ser s1 (s1a,s1b,s1c) o s2 y la región media que puede ser m1 o m2, lo que permite múltiples combinaciones alélicas que se asocian a diferencias en la producción de la citotoxina. Las cepas que expresan el alelo s1 se asocian con úlcera péptica, mayor inflamación gástrica y mayor producción de citotoxina, en comparación con las cepas s2. Además, está identificada como una urea permeasa que promueve la difusión de la urea a través del epitelio <sup>14, 35, 58, 63</sup>.

### *CagA (cytotoxin-associated gene A)*

Es una proteína codificada por el gen *cagA* que no presenta toxicidad por sí misma, pero interviene en la expresión de la toxina vacuolizante. Su presencia se asocia más a síntomas graves como gastritis severa, atrofia de la mucosa, alto riesgo de úlcera y cáncer gástrico. El gen *cagA* es un marcador de una región del genoma denominada “isla de patogenicidad” (PAI) la cual codifica alrededor de 30 genes distintos que modulan la respuesta inflamatoria

local, la producción de citoquinas y las consecuencias de la infección a través de mecanismos aún no bien determinados <sup>1,5,41,46,63</sup>.

#### Lipopolisacárido (LPS)

El LPS de *H. pylori* presenta, al igual que en otras especies bacterianas, una estructura de tres dominios principales, la capa polisacárida externa o cadena específica O, el núcleo oligosacárido y el lípido A. Se ha demostrado que algunas cepas de *H. pylori* presentan cadenas laterales del LPS similares a antígenos alélicos de los grupos sanguíneos Lewis x, Lewis yy Lewis xy. Por lo tanto, el hospedero infectado produciría anticuerpos contra la bacteria y, por reacción cruzada, esos anticuerpos reconocerían a los antígenos del grupo sanguíneo Lewis. Éstos se expresan tanto en eritrocitos como en la cadena  $\beta$  de las ATPasas H, K y en la bomba parietal de protones. Los antígenos del grupo Lewis son blancos potenciales de esos anticuerpos que, actuando como autoanticuerpos, generarían un fenómeno de autoinmunidad que podría determinar la producción de gastritis asociada a *H. pylori* <sup>3,4</sup>.

#### Proteína inductora de TNF- $\alpha$ (Tip $\alpha$ )

La proteína Tip $\alpha$ , secretada por *H. pylori*, tiene actividad carcinogénica a través de la inducción de TNF- $\alpha$  y de la activación de NF- $\kappa\beta$  <sup>1, 46, 54</sup>.



## Hábitat, epidemiología e impacto clínico

*H. pylori* se aísla casi exclusivamente del ser humano y tiene como reservorio la mucosa gástrica, donde sobrevive gracias a su capacidad ureolítica<sup>20, 31, 56</sup>. Se ha propuesto la existencia de reservorios animales y se demostró que en condiciones naturales, *H. pylori* puede ser aislado de primates, del cerdo, del gato y de ovinos<sup>15, 17, 21, 26</sup>.

Estudios seroepidemiológicos mostraron que cerca de la mitad de la población mundial estaba colonizada. La prevalencia en países desarrollados fluctúa entre el 20 y el 40%, mientras que en países en vías de desarrollo ésta varía entre un 70 y un 90%. No obstante, hay evidencias recientes de la disminución de la prevalencia en adultos y niños en países desarrollados y subdesarrollados. Los distintos porcentajes en la prevalencia se relacionan con el grado de hacinamiento, niveles de saneamiento ambiental y niveles socioeconómicos. El mecanismo de transmisión sería principalmente persona a persona ya que existen evidencias epidemiológicas que las vías de ingreso al organismo serían las rutas fecal-oral y oro-oral o gastro-oral. La infección ocurre en la infancia y es menos frecuente en la edad adulta<sup>19, 31, 46, 47, 53, 55, 57, 59</sup>.

El 100% de los individuos infectados presenta gastritis, alrededor del 10% desarrolla úlcera gástrica o duodenal y menos del 1% desarrolla adenocarcinoma o linfoma gástrico<sup>50, 57</sup>.

Existe consenso que *H. pylori* es el principal agente etiológico de úlcera duodenal y una causa importante de úlcera gástrica. Últimamente se ha demostrado la importancia de esta bacteria y su erradicación en el desarrollo de las complicaciones como hemorragia digestiva y perforación.

La erradicación de *H. pylori* reduce el riesgo de hemorragia digestiva por úlcera gástrica y duodenal en pacientes consumidores de antiinflamatorios no esteroideos<sup>33, 66</sup>. También existe interés en estudiar la importancia de *H. pylori* en dispepsia funcional, definida como síntomas inespecíficos del tubo digestivo alto sin causa orgánica. Existe también consenso en la necesidad de erradicar este agente en los pacientes con dispepsia funcional, especialmente en áreas geográficas con alta prevalencia de cáncer gástrico<sup>11, 36, 38</sup>.

*H. pylori* es considerado el principal factor de riesgo de cáncer gástrico. La infección crónica por *H. pylori* conlleva a gastritis crónica activa y sucesivamente a atrofia de la mucosa gástrica, metaplasia intestinal y finalmente el desarrollo de cáncer gástrico. Recientes estudios han demostrado que la erradicación de la bacteria disminuye la atrofia y la metaplasia intestinal. Por el contrario, estos cambios no ocurrieron en los pacientes en que no se logró su erradicación<sup>36</sup>.

Actualmente hay evidencia irrefutable de la relación causal de *H. pylori* en el linfoma gástrico tipo MALT. Alrededor del 90% de este tipo de linfomas están infectados por *H. pylori* y la erradicación de esta bacteria ha logrado su remisión en un 77,5% de los casos. La recaída del linfoma es de alrededor del 8% y no siempre se asocia a infección por *H. pylori*<sup>28, 39</sup>.

Respecto al tratamiento de erradicación de *H. pylori*, hay consenso que el tratamiento actualmente recomendado es la terapia triple: un inhibidor de la bomba de protones asociado a claritromicina y amoxicilina durante 7 a 14 días. En la actualidad, el éxito de esta asociación ha disminuido hasta tasas de erradicación cercanas al 80%. La resistencia antimicrobiana de *H. pylori* es la causa principal de la disminución de la eficacia del tratamiento<sup>22, 48</sup>.

## Sensibilidad a los antibióticos

*H. pylori* es sensible a un gran número de antimicrobianos *in vitro*. Sin embargo, no todos son efectivos para erradicar la infección, ya que para que esto ocurra, el antimicrobiano debe resistir el pH ácido del estómago manteniendo su actividad y tiene que ser capaz de penetrar a las zonas profundas de la mucosa gástrica donde se encuentra alojada la bacteria.

Los antimicrobianos activos sobre *H. pylori* son los  $\beta$ -lactámicos como amoxicilina, macrólidos como azitromicina, claritromicina y roxitromicina, nitroimidazoles como metronidazol y tinidazol, fluoroquinolonas como ciprofloxacina y levofloxacina y tetraciclina. Esta bacteria presenta resistencia natural a trimetoprima, vancomicina, polimixina B, ácido nalidíxico y sulfonamidas.

La erradicación de la infección por *H. pylori* contempla la administración de fármacos inhibidores de la bomba de protones asociada al uso combinado de dos antibióticos. Los esquemas más usados son claritromicina más amoxicilina y claritromicina más metronidazol. Claritromicina es un macrólido que se ha constituido en el antimicrobiano más importante en la terapia combinada para erradicar la infección por este microorganismo. Ejerce un efecto bacteriostático uniéndose a la fracción ribosomal 50S, con la consiguiente inhibición de la síntesis proteica.

La prevalencia de resistencia a este antimicrobiano varía en los distintos países del mundo y su aumento se asocia al uso que tiene este antibiótico en el tratamiento de infecciones extradigestivas. Por otra parte, la resistencia a los macrólidos es cruzada, es decir que abarca tanto a eritromicina como a claritromicina, roxitromicina y azitromicina.

El metronidazol pertenece al grupo de los nitroimidazoles, grupo de quimioterápicos que tienen actividad sobre protozoos, bacterias y en especial bacterias anaerobias. Su mecanismo de acción se debe a que el grupo nitro es reducido al interior de las bacterias, por la acción de nitrorreductasas que lo convierten en hidroxilamina, formando un radical libre que oxida el ADN de la bacteria causando daños en la estructura helicoidal con ruptura de las hebras y pérdida de su funcionalidad. La resistencia al metronidazol en *H. pylori* se produce por mutaciones de las nitrorreductasas que generan formas incompletas de esta enzima, las que dejan de tener la capacidad de activar el fármaco. Además, está relacionada con el uso generalizado del antibiótico para combatir otro tipo de infecciones diferentes de *H. pylori*, hecho que determina que existan variaciones geográficas en la frecuencia de esta resistencia. De hecho, ésta es más alta en países subdesarrollados debido a su uso destinado a combatir enfermedades producidas por protozoarios. Asimismo, se observa una mayor frecuencia de resistencia en cepas aisladas de mujeres, debido a su uso en infecciones ginecológicas.

Amoxicilina, antibiótico  $\beta$ -lactámico que también se usa en terapia combinada para la erradicación de *H. pylori*, es un antibiótico ampliamente usado en clínica para combatir los más diversos cuadros infecciosos. Actúa uniéndose a las proteínas fijadoras de penicilina (PBP, del inglés: *penicillin-binding proteins*), en especial de las PBP1a, que tiene mayor afinidad por la amoxicilina. Una vez que la amoxicilina entra, bloquea la síntesis del peptidoglucano de la pared bacteriana, lo que propicia la lisis celular por desequilibrio osmótico. El mecanismo de resistencia de *H. pylori* consiste en mutaciones de las PBP, en especial de la PBP1a, las que no pueden unirse a

las penicilinas y por lo tanto éstas no pueden actuar. Más recientemente se describió resistencia por la producción de una  $\beta$ -lactamasa TEM 1. No obstante, la resistencia a amoxicilina en *H. pylori* es aún de bajo nivel en todo el mundo.

El problema de la resistencia a los antimicrobianos está directamente relacionado con el ecosistema donde los genes de resistencia y las bacterias confluyen. Los antecedentes recopilados hacen ver la necesidad de mantener una vigilancia permanente en los tratamientos de erradicación de esta bacteria, para lo cual es muy importante conocer las características de las cepas que se aíslan en una población geográficamente definida. Además, el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados permitirá el desarrollo de métodos rápidos de laboratorio para detectar la resistencia a los principales antimicrobianos usados en este tipo de cuadros infecciosos<sup>22, 30, 31, 37, 42, 46, 48, 50,</sup>

62.

### **Diagnóstico de laboratorio**

En general, los métodos diagnósticos que se pueden emplear, se resumen en la tabla 1 y pueden encontrarse descritos en la bibliografía aportada<sup>1, 8, 12, 20, 23, 30, 31, 45, 49, 50, 57.</sup>

El diagnóstico bacteriológico de *H. pylori* se realiza a partir de muestras de biopsias gástricas o duodenales obtenidas por endoscopia.

**Tabla 1.** Métodos diagnósticos para *H. pylori*

Tipo	Fundamento	Métodos
Directos	Demostración directa del microorganismo	Cultivo
		Histología
		Detección de antígenos (bacterias) en deposiciones
Indirectos	Demostración de alguna característica de la bacteria	Capacidad de hidrólisis de la urea (ureasa rápida)
		Respuesta del sistema inmune (anticuerpos)
Invasivos	Requieren endoscopia para toma de muestra (biopsia, cepillado)	Cultivo
		Histología
		Prueba de la ureasa
No invasivos	No requieren endoscopia	Pruebas serológicas (ELISA)
		Prueba del aliento con urea marcada (C <sup>13</sup> o C <sup>14</sup> )

### Examen microscópico directo

La tinción de Gram de estas muestras revela los típicos bacilos gram negativos curvos. Para el Gram es aconsejable utilizar carbolfucsina como colorante de contraste y dejar actuar durante 2 - 5 minutos. También pueden utilizarse otros colorantes como el naranja de acridina y el bromuro de etidio o bien, pueden emplearse coloraciones argénticas (método de Warthin-Starry). También se pueden usar la tinción hematoxilina-eosina y la de Giemsa. Otra alternativa es la inmunohistoquímica o la inmunofluorescencia con anticuerpos mono o policlonales anti-*H. pylori*.

El examen microscópico directo tiene una sensibilidad y una especificidad menor que la del cultivo y para obtener buenos resultados es necesario realizar una impronta densa en el portaobjetos, lo cual se consigue impregnando intensamente la biopsia a lo largo del mismo o bien, colocando sobre el portaobjetos 2 - 3 gotas de la biopsia homogeneizada. Para conseguir mejores resultados, se recomienda utilizar dos biopsias, una de antro y otra de cuerpo.

### Prueba de la urea rápida

Esta es una prueba directa (rápida), que corresponde a un examen presuntivo que detecta la enzima ureasa directamente desde la muestra de biopsia. Consiste en depositar la biopsia en un medio con un indicador que contenga urea, la cual será hidrolizada por la ureasa liberando amonio. El amonio alcaliniza el medio y así produce un cambio de color. Esta prueba permite tener un diagnóstico rápido entre 15 minutos y una hora. Frente a una reacción negativa, se aconseja incubarla hasta 24 h.

En el laboratorio se realiza depositando una biopsia en un tubo (Eppendorf, de hemólisis u otro tubo *ad hoc*) que contenga 1 a 2 ml de caldo urea e incubando a 37 °C por 15 minutos. Una reacción positiva se visualiza por un cambio de color del medio (de naranja a rojo).

Para preparar el caldo urea se disuelven 2 g de urea y 1 mg de rojo fenol en 100 ml de caldo Brucella mediante agitación. Se ajusta a pH 6,8 – 7,0 y se esteriliza mediante filtración por membrana. Esta solución estéril se divide en alícuotas de 1 - 2 ml por tubo y se almacena a 4 °C.

Para esta prueba puede utilizarse también la urea de Christensen o bien medios comerciales. Existen diferentes medios comerciales y todos ellos contienen urea a diferentes concentraciones. Se estima que conviene que el medio contenga hasta un máximo del 6% porque concentraciones superiores podrían inhibir la enzima. Estos medios comerciales varían en su diseño: existen pruebas de gelosa como Clotest®, HUTtest® y Hpfast® en los que la muestra se introduce en un medio semisólido que contiene los reactivos, pruebas de membrana, en los que los reactivos están contenidos en una tira de papel como Pyloriteck® y Pronto Dry® y ensayos en medio líquido como Helicochek®. La sensibilidad de estos métodos varía del 90 a 95% y la especificidad del 95 al 100%.

### Cultivo

El cultivo es un examen de certeza y se realiza a partir de la biopsia lo más rápidamente posible después de la toma de muestra para evitar la pérdida de viabilidad que podría producirse por la desecación o por el efecto nocivo del oxígeno para *H. pylori*. Si el procesamiento no se realizara de inmediato, se debería introducir la biopsia en un tubo estéril con 0,5 ml de solución salina (o un medio líquido como caldo tioglicolato) donde podría permanecer hasta 6 horas. Si no es procesada en este tiempo, la muestra debe depositarse en un medio de transporte semisólido, donde puede mantenerse hasta 48 h a 4 °C.

El medio de cultivo utilizado corresponde a un agar sangre de base nutritiva rica (agar Columbia, agar Mueller Hinton, agar Brucella, agar infusión cerebro corazón, etc.), y puede ser adicionado de diferentes combinaciones de



antimicrobianos para conferirle poder selectivo (colistina + ácido nalidíxico, vancomicina + polimixina + trimetoprima + anfotericina o vancomicina + trimetoprima + cefsulodina + anfotericina). La sangre se adiciona entre el 7 y el 10% y puede ser de caballo o de carnero. También se puede utilizar suero sanguíneo en lugar de sangre.

En el comercio se encuentran medios elaborados específicamente para cultivar *H. pylori*. En la tabla 2 se ejemplifica un medio de cultivo para el diagnóstico de *H. pylori*.

La incubación se realiza a 37 °C, en microaerobiosis estricta (5-10% de O<sub>2</sub>, 5-10% de CO<sub>2</sub> y 80-90% de N<sub>2</sub>). Debido al crecimiento lento de *H. pylori*, ésta debe prolongarse hasta por lo menos 7 días antes de informar la muestra como negativa. Las colonias son pequeñas, no mayores de 1 mm de diámetro y pueden presentar hemólisis.

La identificación se realiza mediante visualización en fresco con un microscopio de contraste de fases para ver la morfología y la movilidad característica en sacacorchos o bien, mediante una tinción de Gram, donde se observa la presencia de bacilos gram negativos curvoespiralados con cierto grado de pleomorfismo. Las pruebas positivas de catalasa, ureasa y oxidasa confirman la identificación como *H. pylori*.

**Tabla 2.** Medio de cultivo para *H. pylori*

<b>Base</b>	Rica en nutrientes, especialmente en aminoácidos (Agar Columbia u otro similar)
<b>Mezcla antibiótica (DENT)</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• vancomicina 10 mg/l</li><li>• trimetoprima 5 mg/l</li><li>• cefsulodina 5 mg/l</li><li>• anfotericina B 5 mg/l</li></ul> <p>Nótese que los frascos comerciales vienen dosificados para 500 ml de medio</p>
<b>Sangre</b>	5% de sangre desfibrinada de caballo o de carnero
<b>Procedimiento</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Pesar la cantidad de polvo del medio de cultivo recomendada por el fabricante para 500 ml</li><li>• Disolver en agua y ajustar al pH indicado por el fabricante</li><li>• Autoclavar</li><li>• Dejar enfriar a 56 °C y agregar:<ul style="list-style-type: none"><li>- el suplemento DENT previamente disuelto en agua</li><li>- 5% de sangre de caballo o de carnero</li></ul></li></ul>

### Otros métodos diagnósticos

#### Prueba del aliento (Urea Breath Test - UBT)

Se trata de un método diagnóstico no invasivo de *H. pylori*. Se basa en la capacidad de la ureasa producida por *H. pylori* para hidrolizar rápidamente una solución de urea marcada con  $C^{13}$  o  $C^{14}$  ( $^{*}C$ ), previamente ingerida por el paciente. Treinta minutos después de la ingestión se mide la relación  $^{*}C/C$  en el aire exhalado por los pacientes. En las personas infectadas con *H. pylori* se detecta un aumento significativo de  $^{*}CO_2$ . Es una prueba fácil, simple de realizar, bien tolerada que detecta infección activa incluso ante pequeñas

cantidades de *H. pylori* ya que valora la totalidad de la mucosa gástrica. Se recomienda no utilizarla en menores de 14 años ni en gestantes por su calidad de ser radioactiva. La sensibilidad y especificidad de esta prueba se encuentran en alrededor de 88 a 95% y de 95 a 100% respectivamente.

## Serología

Por la estrecha correlación que existe entre la presencia de la bacteria y el desarrollo de anticuerpos séricos, varias pruebas serológicas han sido utilizadas con fines diagnósticos. Una de las más utilizadas es la técnica de ELISA con el empleo de diversos antígenos somáticos para detectar anticuerpos IgG o IgA en el suero, sangre total u orina del paciente. Es una técnica de bajo costo, sin embargo no diferencia entre una infección activa o pasada. La sensibilidad se encuentra alrededor del 90 al 100% mientras que la especificidad varía entre el 76 y el 96%.

También existen métodos basados en la técnica del Western Blot y se utilizan para el estudio de la respuesta frente a antígenos específicos, como CagA y VacA.

## Detección del antígeno en heces

Este es un método directo, no invasivo, que permite la detección de antígenos de *H. pylori* en muestras de heces. Existen varios sistemas comerciales que permiten detectar la presencia de antígeno en heces usando anticuerpos policlonales o monoclonales.

Este tipo de ensayo es de carácter cualitativo (no cuantitativo) pero sin embargo aporta una información valiosa por la fácil obtención y conservación de las muestras, porque se puede realizar en cualquier laboratorio de microbiología y no necesita la colaboración del paciente (como en el caso de la prueba del aliento). Es muy útil para verificar el diagnóstico etiológico en niños pequeños. También estos métodos han sido descritos como válidos para establecer el diagnóstico inicial, para el seguimiento después del tratamiento de erradicación y comprobar la reaparición de una infección.

#### Métodos moleculares

La mayoría de las técnicas se basan en la prueba de PCR, tanto clásica como en tiempo real y permiten demostrar la presencia del genoma de esta bacteria en muestras de saliva, deposiciones y de biopsia gástrica.

El objetivo de todas ellas ha sido la detección de:

- genes específicos de la bacteria como el gen de la ureasa (*ureA* o *ureC*), el gen *16S rRNA* u otros genes.

- factores de virulencia. Aunque se han realizado numerosos estudios, actualmente no tienen una clara aplicación práctica pues no se puede caracterizar a una cepa como más patógena con el fin de tratar o no, en base a la presencia de estos genes de virulencia.

- mecanismos de resistencia

La técnica de PCR presenta una especificidad y sensibilidad cercanas al 100% y generalmente se utiliza con fines de investigación ya que es una

técnica compleja que requiere equipos especiales y todavía es de costo elevado.

### Métodos de estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos

Los métodos fenotípicos usados para medir la sensibilidad de *H. pylori* a los antimicrobianos son la microdilución en caldo, la dilución en agar, la difusión en agar y el método epsilométrico. Sin embargo el Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), recomienda sólo el uso del método de dilución en agar, usando agar Mueller Hinton con la adición de 5% de sangre de carnero.

El inóculo se prepara en suero fisiológico, suspendiendo la bacteria a una turbiedad equivalente a la del tubo 2 de MacFarland, sembrando entre 1 a 3  $\mu$ l por placa y por dilución, e incubando en atmósfera de microaerobiosis por 72 h. El diseño de este método incluye solamente puntos de corte para claritromicina:  $\leq 0,25$ , 0,5 y  $\geq 1$   $\mu$ g/mL para las categorías sensible, intermedio y resistente respectivamente. También se puede usar el método epsilométrico (Etest o similares) que tiene una buena correlación con el método de dilución en agar.

Existen métodos genotípicos para determinar la sensibilidad de *H. pylori*, tanto a partir de cultivos como de muestras de biopsias. Éstos son la reacción de polimerasa en cadena asociada a análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) y PCR en tiempo real.

Mutaciones en la posición 2142 o 2143 de los genes que codifican el ARN ribosomal 23S, provocan una modificación de la estructura ribosómica que impide la unión al macrólido, con lo cual éste no puede actuar. Una prueba

de PCR-RFLP para detectar mutaciones en los 2 genes que codifican el ARN ribosomal 23S permitió establecer que la mutación A-G de la posición 2142 del gen estaba asociada con niveles más altos de resistencia a claritromicina (CIM >256 µg/ml), en relación a la mutación en la posición 2143, en que las CIM pueden fluctuar entre <0,16 µg/ml a >256 µg/ml<sup>13, 30, 31</sup>.

## Consideraciones finales

El género *Helicobacter* es un taxón que, en los últimos años, ha experimentado una notable expansión, tanto en el número de las especies que lo componen, como desde el punto de vista de sus reservorios. Desde el punto de la patología humana, es evidente que la mayor atención se ha centrado siempre en *H. pylori*. Sin embargo, existen otras especies, denominadas genéricamente como “*non-H. pylori*” que tienen potencial patogénico. Algunas de estas especies, conocidas como *Helicobacter* gástricos pueden colonizar la mucosa gástrica y otras, denominadas *Helicobacter* enterohepáticos, colonizan la mucosa intestinal y/o el sistema hepatobiliar. Muchas de ellas han sido aisladas tanto del ser humano como de animales y se las considera como agentes zoonóticos.

Es posible que, en el futuro, aparezcan nuevas especies de *Helicobacter* y que aquellas encontradas hasta ahora exclusivamente en animales puedan, también, ser aisladas del ser humano y de otros huéspedes diferentes al considerado su reservorio natural.

El laboratorio de microbiología deberá estar preparado para enfrentar la problemática diagnóstica que estas especies pueden representar como

también para contribuir a esclarecer la epidemiología de ellas y su rol en patologías a las cuales parecen asociarse. Tal vez, en lo inmediato sean motivo de preocupación las especies “*non-H. pylori*”, en las cuales es necesario establecer el espectro de sus reservorios, dilucidar el eventual carácter zoonótico de algunas de ellas, verificar el rol del agua y del ambiente en su transmisión y confirmar su participación en ciertas patologías crónicas, como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa, en las cuales parecería que tuviesen algún rol<sup>9, 49, 56</sup>.

## Bibliografía

1. Agudo Pena S. Estudio molecular de los factores de virulencia y de la resistencia a claritromicina en la infección por *Helicobacter pylori*. Memoria para optar al grado de Doctor. Universidad Complutense de Madrid, 2010. <http://eprints.ucm.es/11520/1/T32213.pdf>
2. Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterol.* 2008; 134:306–23.
3. Appelmek BJ, Simoons-Smit I, Negrini R, Moran AP, Aspinall GO, Forte JG, De Vries T, Quan H, Verboom T, Maaskant JJ, Ghiara P, Kuipers EJ, Bloemena E, Tadema TM, Townsend RR, Tyagarajan K, Crothers JM Jr, Monteiro MA, Savio A, De Graaff J. Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group in autoimmunity. *Infect Immun.* 1996; 64: 2031-40.
4. Bäckström A, Lundberg C, Kersulyte D, Berg DE, Borén T, Arnqvist A. Metastability of *Helicobacter pylori* bab adhesin genes and dynamics in Lewis b antigen binding. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:16923–8.
5. Batista SA. Higher number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. *BMC Microbiol.* 2011; 11:61.
6. Blanchard TG, Nedrud JG. Laboratory maintenance of *Helicobacter* species. *Curr Protocols Microbiol.* 2006; 8B.1.1-8B.1.13.

7. Blaser MJ, Berg DE. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. J Clin Invest. 2001; 107: 767–73.
8. Calvet X, Lario S, Ramírez-Lázaro MJ, Montserrat A, M Quesada, Reeves L, Masters H, Suárez-Lamas D, Gallach M, Sánchez-Delgado J, Martínez-Bauer E, Miquel M, Junquera F, Sanfeliu I, Segura F. Comparative accuracy of 3 monoclonal stool tests for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection among patients with dyspepsia. Clin Infect Dis. 2010; 50:323–8.
9. Ceelen L, Haesebrouck F, Favoreel H, Ducatelle R, Decostere A. The cytolethal distending toxin among *Helicobacter pullorum* strains from human and poultry origin. Vet Microbiol. 2006; 113: 45–53.
10. Cervantes GE. *Helicobacter pylori* e infecciones asociadas. Rev Fac Med UNAM. 2006; 49: 163–8.
11. Chey WD, Wong BCY and the Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. Am J Gastroenterol. 2007;102:1808-25.
12. Chisholm SA, Teare EL, Davies K, Owen RJ. Surveillance of primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* at centres in England and Wales over a six-year period (2000-2005). Euro Surveill. 2007; 12: E3-E4.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement M100-S20. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA, 2010.
14. Clyne M, Dolan B, Reeves EP. Bacterial factors that mediate colonization of the stomach and virulence of *Helicobacter pylori*. FEMS Microbiol Lett. 2007; 268: 135–43.
15. Dore MP, Sepulveda AR, El-Zimaity H, Yamaoka Y, Osato MS, Mototsugu K, Nieddu AM, Realdi G, Graham DY. Isolation of *Helicobacter pylori* from sheep—implications for transmission to humans. Am J Gastroenterol. 2001; 96:1396 –401.
16. Drasar BS. The bacterial flora of the stomach and small intestine. Gastroenterol Clin Biol. 1989; 13: 18B-20B.
17. Dubois A, Fiala N, Heman-Ackah LM, Drazek ES, Tarnawsky A, Fishbein WN, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Natural gastric infection with *Helicobacter pylori* in monkeys: a model for spiral bacteria in humans. Gastroenterol. 1994; 106: 1405-17.



18. Euzéby JP. List of prokaryotic names with standing in nomenclature - Genus *Helicobacter*. <http://www.bacterio.cict.fr/h/helicobacter.html>
19. Everhard JE. Recent developments in epidemiology of *Helicobacter pylori*. Gastroenterol Clin North Am. 2000; 29: 559-78.
20. Fernández H. Género *Helicobacter*: Un grupo bacteriano en expansión, con características zoonóticas. Gaceta Infectol Microbiol Clín Latinoam. 2012; 2: 11-20.
21. Fox JG. Non-human reservoirs of *Helicobacter pylori*. Aliment Pharmacol Ther. 1995; 9 (Suppl. 2): 93-103.
22. Gisbert JP, Calvet X. Review article: the effectiveness of standard triple therapy for *Helicobacter pylori* has not changed over the last decade, but it not good enough. Aliment Pharmacol Ther. 2011; 34: 1255-68.
23. González CG, Serrano C, Harris PR. Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* en niños mediante la detección de antígenos en deposiciones. Rev Med Chil. 2007; 135: 182-8.
24. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins D, Sly L, McConnell W, Harper WES. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. Int J Syst Bacteriol. 1989; 39: 397-405.
25. Greenlaw R, Sheahan DG, DeLuca V. Gastroduodenitis. A broader concept of peptic ulcer disease. Dig Dis Sci. 1980; 25: 660-72.
26. Handt LK, Fox JG, Dewhirst FE, Fraser GJ, Paster BJ, Yan LL, Rozmiarek H, Rufo R, Stalis IH. *Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: public health implications. Infect Immun. 1994; 62: 2367-74.
27. Kielbauch JA, Cameron DN, Wacchsmuth IK. Evaluation of ribotyping techniques as applied to *Arcobacter*, *Campylobacter* and *Helicobacter*. Mol Cel Prob. 1994; 8: 109-16.
28. Kodama M, Murakami K, Okimoto T, Abe T, Nakagawa Y, Mizukami K, Uchida M, Inoue K, Fujioka T. *Helicobacter pylori* eradication improves gastric atrophy and intestinal metaplasia in long-term observation. Digestion. 2012; 85: 126-30.
29. Kuster JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev. 2006; 19: 449–90.

30. Latorre R, Gallo G. *Helicobacter pylori*: su importancia práctica en la Gastroenterología. Rev Med Clin Condes. 2008; 19: 323-9.
31. Lawson AJ. *Helicobacter*. En: Versalovic JV, Carrol KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. Manual of Clinical Microbiology. Washington D.C., ASM Press, 2011, p. 900-15.
32. Lim RKS. A parasitic spiral organism in the stomach of the cat. Parasitol. 1920; 12:108-13.
33. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Artherton J, Axon ATR, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, El-Omar EM, Kuipers EJ; European *Helicobacter* Study Group. The European *Helicobacter* Study Group (EHSG). Management of *Helicobacter pylori* infection the Maastricht IV/Florence Consensus Report. Gut. 2012; 61: 646-64.
34. Marshall BJ. The *Campylobacter pylori* story. Scand J Gastroenterol. 1988; 23 (Suppl 146): 58-66.
35. Martínez A, González C, Kawaguchi F, Montoya R, Corvalán A, Madariaga J, Roa J, García A, Salgado F, Solar H, Palma M. *Helicobacter pylori*: análisis de CagA y genotipificación de VacA en Chile. Detección de una cepa s2/m1. Rev Méd Chil. 2001;129: 1147-53.
36. Mazzoleni LE, Sander GB, Francesconi CF, Uchoa DM, De Bona LR, Milbradt TC, Von Reisswitz PS, Berwanger O, Bressel M, Edelweiss MI, Marini SS, Molina CG, Folador L, Lunkes RP, Heck R, Birkhan OA, Spindler BM, Katz N, Colombo Bda S, Guerrieri PP, Renck LB, Grando E, Hocevar de Moura B, Dahmer FD, Rauber J, Prolla JC. *Helicobacter pylori* eradication in functional dyspepsia: HEROES trial. Arch Intern Med. 2011; 171: 1929-36.
37. Mégraud F, Corti R. Resistencia bacteriana del *Helicobacter pylori* en el mundo en el año 2009. Acta Gastroenterol Latinoam. 2009; 39:282-90.
38. Miwa H, Ghoshal UC, Fock KM, Gonlachanvit A Gwee KA, Ang TL, Chang FY, Hongo M, Hou X, Kachintorn U, Ke M, Lai KH, Lee KJ, Lu CL, Mahadeva S, Miura S, Park H, Rhee PL, Sugano K, Vilaichone RK, Wong BC, Bak YT. Asian consensus report on functional dyspepsia. J Gastroenterol Hepatol. 2012; 27: 626-41.
39. Nakamura S, Sugiyama T, Matsumoto T, Iijima K, Ono S, Tajika M, Tari A, Kitadai Y, Matsumoto H, Nagaya T, Kamoshida T, Watanabe N, Chiba T, Origasa H, Asaka M, for the JAPAN GAST Study Group. Long-term clinical outcome of gastric MALT lymphoma after

eradication of *Helicobacter pylori*: a multicentre cohort follow-up study of 420 patients in Japan. *Gut*. 2012; 61:507-13.

40. On SLW, Lee A, O'Rourke JL, Dewhirst FE, Paster BJ, Fox JG, Vandamme P. Genus I. *Helicobacter*. En: Brenner DJ, Krieg NR, Staley J T, Garrity G, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer, New York, NY. 2005, p. 1169–89.

41. Ortiz-Princz D, Guariglia-Oropeza V, Ávila M, Correnti M, Perrone M, Gutierrez B, Torres J, Megraud F, Cavazza ME. *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* genotypes in Cuban and Venezuelan populations. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010; 105: 331-5.

42. Pajares García JM, Pajares-Villarroya R, Gisbert JP. *Helicobacter pylori*: resistencia a los antibióticos. *Rev Esp Enferm Dig (Madrid)*. 2007; 99: 63-70.

43. Parsonnet J. *Helicobacter pylori*. *Infect Dis Clin North Am*. 1998; 12: 185– 97.

44. Radosz-Komoniewska H, Bek T, Józwiak J, Martirosian G. Pathogenicity of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Infect*. 2005; 11: 602–10.

45. Raguza D, Machado RS, Ogata SK, Granato CFH, Patricio FRS, Kawakami E. Validation of a monoclonal stool antigen test for diagnosing *Helicobacter pylori* infection in young children. *J Ped Gastroenterol Nutr*. 2010; 50: 400-3.

46. Ramírez A, Sánchez R. *Helicobacter pylori* 25 años después (1983-2008): epidemiología, microbiología, patogenia, diagnóstico y tratamiento. *Rev Gastroenterol Perú*. 2009; 29:1-22.

47. Ramírez Ramos A, Chinga Alayo E, Mendoza Requena D, Leey Casella J, Segovia Castro MC, Otoyá C. Variación de la prevalencia del *H. pylori* en el Perú. Período (1985-2002), en una población de nivel socioeconómico medio y alto. *Rev Gastroenterol Perú*. 2003; 23: 92-8.

48. Rimbara E, Fischbach LA, Graham DY. Optimal therapy for *Helicobacter pylori* infections. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011; 8: 79-88.

49. Rivas-Traverso F, Hernández F. *Helicobacter pylori*: factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Rev Biomed*. 2000; 11: 187-205.

50. Rollán A. Infección por *Helicobacter pylori*. En: Weitz JC, Burer Z, Sabah S, Silva H. editores. *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades digestivas*. Santiago, Sociedad Chilena de Gastroenterología, 2008, p. 113-25.

51. Sheri P, Cirillo D, Kagnoff MF, Guiney DG, Eckmann L. Coccoid and spiral *Helicobacter pylori* differ in their abilities to adhere to gastric epithelial cells and induce interleukin-8 secretion. *Infect Immun.* 1997; 65:843-6.
52. Skirrow MB. Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. *J Comp Pathol.* 1994; 111: 113-49.
53. Sonnenberg A, Lash RH, Genta RM. A national study of *Helicobacter pylori* infection in gastric biopsy specimens. *Gastroenterol.* 2010; 139: 1894-901.
54. Suganuma M, Yamaguchi K, Ono Y, Matsumoto H, Hayashi T, Ogawa T, Imai K, Kuzuhara T, Nishizono A, Fujiki H. TNF-alpha-inducing protein, a carcinogenic factor secreted from *H. pylori*, enters gastric cancer cells. *Int J Cancer.* 2008; 123: 117-22.
55. Tanih NF, Ndip LM, Clarke AM, Ndip RN. An overview of pathogenesis and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Afr J Microbiol Res.* 2010; 4: 426-36.
56. Thomson JM, Hansen R, Berry SH, Hope ME, Murray GI, Mukhopadhyaya I, McLean MH, Shen Z, Fox JG, El-Omar E, Hold GL. Enterohepatic *Helicobacter* in ulcerative colitis: potential pathogenic entities? *PLoS ONE.* 2011; 6: e17184.
57. Toledo Araya H, Defilippi Cafri C, Cáceres Lillo D, Defilippi Guerra C, Vallejos C, Madrid Silva AM, Venegas Santos M. Prevalencia de la Infección por *Helicobacter pylori* según ensayo de la ureasa en pacientes derivados de la unidad de endoscopía del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. *Rev Hosp Clin Univ Chile.* 2007; 18: 189-93.
58. Tombola F, Morbiato L, Del Giudice G, Rappuoli R, Zoratti M, Papini E. The *Helicobacter pylori* VacA toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. *J Clin Invest.* 2001; 108:929-37.
59. Tonkic A, Tonkic M, Lehours Ph, Mégreud F. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2012; 17 (suppl. 1) 1-8.
60. Urquiola E, García-Guerra D, Montiel L. La úlcera gastroduodenal. Historia de una enfermedad. Barcelona, Ediciones Doyma, 1987. Vol 1, p. 55-6.
61. Vaira D, D'Anastasio C, Holton J, Dowsett JF, Londei M, Bertoni F, Beltrandi E, Grauenfels P, Salmon PR, Gandolfi L. *Campylobacter pylori* in abattoir workers: is it a zoonosis. *Lancet.* 1988; 2: 725-6.

62. Vallejos C, Cerda O, Valenzuela M, Toledo H. Resistencia antimicrobiana en *Helicobacter pylori*: aspectos clínicos y moleculares. Rev Méd Chil. 2003; 131: 1313-20.
63. van Door, LJ, Figueiredo C, Rossau R, Jannes G, van Asbroeck M, Sousa JC, Carneiro F, Quint WGV. Typing of *Helicobacter pylori vacA* gene and detection of *cagA* gene by PCR and reverse hybridization. J Clin Microbiol. 1998; 36: 1271–6.
64. Vandamme P, Falsen E, Rossau R, Hoste B, Segers P, Tytgat, R, De Ley J. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter* and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. Int J Syst Bacteriol. 1991; 41: 88-103.
65. Vandamme P, Goosens H. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter*: a review. Zentralbl Bakteriologie. 1992; 276: 447-72.
66. Vergara M, Catalan M, Gisbert JP, Carvet X. Metaanálisis: role of *Helicobacter pylori* eradication in the prevention of peptic ulcer in NSAID users. Aliment Pharmacol Ther. 2005; 21:1411-8.
67. Warren JR, Marshall BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet. 1983; i:1273–5.
68. Yoshiyama H, Nakazawa T. Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. Microbes Infect. 2000; 2: 55-60.

## **Capítulo II.c.4.6**

### **Familia *Campylobacteraceae***

**HERIBERTO FERNÁNDEZ**

Instituto de Microbiología Clínica  
Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile.  
Valdivia, Chile

**CARLOS DANIEL ROLDÁN**

Hospital de Pediatría “Prof. Dr. Juan P. Garrahan”  
Buenos Aires, Argentina.

## Características generales y constitución de la familia

La familia *Campylobacteraceae* pertenece a la clase Epsilonproteobacteria, orden Campylobacterales. Está formada por bacilos gram negativos curvos, en forma de S itálica o espiralados. Miden de 0,2 a 0,9  $\mu\text{m}$  de espesor por 0,5 a 5  $\mu\text{m}$  de longitud. No forman esporas pero, en cultivos viejos, se transforman en cuerpos esféricos o cocoides, con pérdida de su viabilidad. Son móviles por flagelación monótrica o anfítrica. Presentan metabolismo de tipo respiratorio y es la menaquinona la única quinona respiratoria que poseen. La gran mayoría de las especies son microaerófilas estrictas. Algunas pueden crecer en aerobiosis y otras en anaerobiosis. Todas son oxidasa positivas e incapaces de fermentar u oxidar hidratos de carbono. Obtienen su energía de aminoácidos o de intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico que no deriven de hidratos de carbono. La composición citosina-guanina fluctúa entre 28 y 46 mol%. Esta familia bacteriana agrupa los géneros *Campylobacter*, *Arcobacter* y *Sulfurospirillum*. Los dos primeros géneros contienen especies patógenas para el hombre y para animales mientras que el género *Sulfurospirillum* está formado por especies de vida libre aisladas de ambientes acuáticos<sup>22, 46</sup>.

### Género *Campylobacter*

El género *Campylobacter* (del griego: *kampulos*, curvo; *bacter*, bacteria) está constituido por especies de naturaleza zoonótica y de distribución

ecológica diversa, capaces de colonizar al hombre y a los animales y cuya morfología microscópica conserva las características generales de los miembros de la familia.

Las bacterias del género *Campylobacter* son gram negativas, pequeñas (0,3-0,6  $\mu\text{m}$  de diámetro, 0,5-8  $\mu\text{m}$  de longitud), no esporuladas, con una forma distintiva curva o en espiral, con aspecto de *Vibrio* cuando se observan a partir de cultivos jóvenes. Algunas especies con más de 48 horas de incubación o tras prolongada exposición al aire adoptan una forma cocoide no recuperable en subcultivos, conocidas como formas viables no cultivables <sup>15, 22, 32, 46, 97, 133</sup>.

Presentan un flagelo único, no envainado, en uno o en sus dos extremos y se mueven característicamente en forma rápida, con giros sobre su propio eje, a modo de sacacorchos. Casi todas las especies son sensibles al oxígeno y solo pueden desarrollar en condiciones de microaerobiosis con reducción de oxígeno y aumento de  $\text{CO}_2$ , (5-10% de oxígeno). Además, algunas especies requieren hidrógeno para crecer. Todas las especies son capaces de desarrollar a 37 °C. Algunas tienen una temperatura óptima de crecimiento de 42 °C, por lo que es una práctica habitual en el laboratorio la incubación a esta temperatura con el fin de facilitar el aislamiento selectivo. Su velocidad de desarrollo es más lenta que la de las bacterias de la microbiota normal entérica por lo que, para su aislamiento a partir de materia fecal, se requieren medios de cultivo selectivos que inhiban esa microbiota acompañante <sup>15, 32, 46, 97, 133</sup>.

Aquellas especies de *Campylobacter* que son capaces de crecer a 42 °C - 43 °C pero no a 25 °C son llamadas también termófilos o termotolerantes y corresponden a las especies y subespecies *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* y *Campylobacter upsaliensis* <sup>32, 46, 133</sup>.



Las dos especies más frecuentemente aisladas de materiales clínicos son *C. jejuni* subsp. *jejuni* y *C. coli* y ambas producen diarrea de tipo inflamatorio <sup>15, 22, 32, 46, 90, 97, 112, 37</sup>.

A pesar de que las primeras descripciones de este tipo de bacterias fueron hechas por Escherich en 1886 y los primeros aislamientos fueron realizados a comienzos de este siglo, fue solamente en la década del 70 que estos microorganismos adquirieron importancia en microbiología clínica por haberse establecido, en esa época, la capacidad de algunas especies del género para producir diarrea en el ser humano <sup>32</sup>. En la actualidad, son reconocidos como agentes causales de primer orden en la génesis de la diarrea infecciosa en adultos y en niños, tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo <sup>33, 72, 133</sup>.

Actualmente, el género *Campylobacter* incluye 25 especies y nueve subespecies, las cuales reconocen como reservorio natural a mamíferos y aves, tanto domésticos como de vida libre <sup>30, 90</sup>. En la Tabla 1 se indican las principales especies de *Campylobacter* encontradas en asociación con procesos infecciosos del ser humano y se señalan sus principales reservorios y enfermedades asociadas en el hombre y en los animales. Algunas de ellas serán descritas con mayor detalle a continuación.

**Tabla 1.** Principales especies de *Campylobacter* encontradas en asociación con procesos infecciosos del ser humano

Especies	Reservorios	Enfermedad en el ser humano	Enfermedad en animales
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	Bovinos, ovinos	Septicemia, enteritis, aborto, meningitis	Aborto espontáneo en bovinos y ovinos
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	Bovinos	Septicemia (muy rara)	Infertilidad infecciosa en el bovino
<i>C. upsaliensis</i>	Perros, gatos, primates	Enteritis, septicemia	Gastroenteritis en perros y gatos
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	Cerdos, bovinos, hamsters	Enteritis, septicemia	Enteritis en cerdos y bovinos
<i>C. concisus</i>	Humanos	Enfermedad periodontal, enteritis, septicemia	No descrita aún
<i>C. sputorum</i> subsp. <i>sputorum</i>	Humanos, bovinos, ovinos, cerdos	Abscesos	Enteritis necrótica en cerdos
<i>C. lari</i>	Gaviotas, otras aves, perros, gatos	Enteritis, septicemia	No descrita aún
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	Humanos (con y sin diarrea), perros y gallinas	Enteritis, septicemia	No descrita aún
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	Aves y mamíferos	Gastroenteritis, septicemia	Enteritis en perros y gatos jóvenes, aborto en ovinos
<i>C. coli</i>	Aves y mamíferos	Gastroenteritis, septicemia	Enteritis en perros y gatos jóvenes, aborto en ovinos
<i>C. curvus</i>	Humanos	Infección de la cavidad oral, enteritis, septicemia, peritonitis	No descrita aún
<i>C. gracilis</i>	Humanos	Infección gingival, infecciones de vísceras, cabeza y cuello, abscesos, empiemas	No descrita aún
<i>C. showae</i>	Humanos	Placa dentaria, infección de canales dentarios	No descrita aún

## Epidemiología y características clínicas

*Campylobacter* es un microorganismo ubicuo. Se aísla de una gran cantidad de animales domésticos y salvajes, los cuales representan un reservorio de grandes proporciones. También se aísla del agua, de alimentos de origen animal como leche y carne, del medio ambiente y, también, del ser humano <sup>10, 15, 17, 27, 33, 61, 79, 97</sup>.

La infección se adquiere por vía oro-fecal, por la ingesta de agua y alimentos contaminados o por contacto con animales y portadores. También se ha sugerido el contacto persona-persona pero, éste es poco frecuente. El período de incubación varía de uno a siete días y, en el período prodrómico, el paciente presenta cefalea, fiebre, mialgias y dolor abdominal. Normalmente se presenta como una diarrea aguda, que puede variar de leve a severa, pero que siempre es autolimitada, con una duración máxima de una semana. En algunos casos puede asociarse con apendicitis, megacolon tóxico, colecistitis y otras complicaciones. También puede ocurrir infección neonatal, la cual es adquirida de la madre portadora durante el parto. Igualmente, se pueden presentar secuelas o complicaciones posinfecciosas como son la artritis infecciosa reactiva, el síndrome de Guillain Barré y su variedad oftalmológica, el síndrome de Miller Fisher. La artritis se presenta en alrededor del 1% de los pacientes con diarrea por *Campylobacter* y es un factor de riesgo en personas portadoras del antígeno HLA B27. El síndrome de Guillain Barré corresponde a una polineuropatía inflamatoria desmielinizante que se presenta con una frecuencia de 1-2 casos por cada 1.000 pacientes. Este síndrome está asociado con más frecuencia con los serotipos O:19 y O:41 debido a que los glucolípidos del

lipopolisacárido en estos serotipos son muy semejantes al gangliósido GM1 y se producen reacciones cruzadas con las estructuras neuronales. En algunos países en desarrollo los serotipos Z2 y Z5 han sido encontrados asociados a este síndrome <sup>5, 10, 15, 27, 53, 59, 64, 88, 110, 124, 133</sup>.

La infección por *Campylobacter* se acompaña, la mayoría de las veces, con el aumento de títulos séricos de IgA, IgM e IgG. Las primeras en aparecer, aproximadamente al sexto día, son la IgA y la IgM. La IgG aparece alrededor del decimosegundo día. Estos anticuerpos alcanzan los niveles más altos aproximadamente a la tercera semana. La primera en desaparecer es la IgA, entre la cuarta o la quinta semana, y luego, la IgM, la cual es detectable por tres meses aproximadamente. La IgG puede ser encontrada en el suero después de tres a seis meses de ocurrida la infección. Por esta razón, la detección de IgA específica en una única muestra de suero es útil para establecer infección reciente. Para pesquisas serológicas, las dos primeras inmunoglobulinas específicas deben ser estudiadas en, por lo menos, dos muestras de suero, una en la fase aguda y la otra, entre dos y tres semanas después. Esto es importante para poder establecer serológicamente la participación de *Campylobacter* en casos de Guillain Barré. Existen evidencias que estos anticuerpos pueden determinar un período de excreción más corto, además de impedir la expresión de manifestaciones clínicas en muchos portadores de la bacteria. En países en desarrollo, donde el contacto con la bacteria es precoz y las oportunidades de infección y reinfección son mayores, se encuentran altos títulos de IgG en personas normales, portadoras de *Campylobacter* <sup>8, 32, 64, 118, 124, 133</sup>.

La diarrea por *Campylobacter* afecta a todos los grupos etarios de ambos sexos, pero es predominante en los primeros cinco años de vida. En los países industrializados, *C. jejuni* es la principal causa de diarrea y la frecuencia de portadores asintomáticos es muy baja. En América del Sur y en países con condiciones socioeconómicas semejantes, donde *Campylobacter* es endémico, esta bacteria se encuentra en el 10 - 35% de los niños con diarrea. También se han observado altas tasas, a veces superiores al 10%, en portadores sanos. La elevada tasa de portadores asintomáticos parece estar relacionada con la presencia de anticuerpos séricos que surgen como consecuencia de infecciones repetidas. Aparentemente esto parece ser muy frecuente en individuos que viven en condiciones precarias o con saneamiento básico insatisfactorio, o que, por razones laborales, mantienen estrecho contacto con animales u otras fuentes de infección. En los países de clima templado, la infección predomina en el verano <sup>5, 10, 15, 27, 33, 40, 45, 61, 72, 97, 133</sup>.

Con fines epidemiológicos se han usado varios sistemas de tipificación. El más accesible es la biotipificación que, además de permitir la identificación a nivel de especie, permite la diferenciación en biovares. El sistema propuesto por Lior es el más utilizado por su sencillez y reproducibilidad. También han sido propuestas, con este propósito, la tipificación por fagos, la determinación del perfil plasmídico, el antibiotipo y la tipificación serológica. Para esta última se pueden utilizar dos esquemas para subdividir las especies en serogrupos. Uno de ellos se basa en la composición de los antígenos somáticos termoestables (antígenos O) y el otro, en la composición de los antígenos flagelares (H) y somáticos (posiblemente K) termolábiles. El último esquema es el más difundido y permite reconocer más de 90 serogrupos en las especies

termotolerantes. De ellos, más de 60 corresponden a *C. jejuni*. Alrededor del 90% de las cepas aisladas del hombre y de animales pertenecen a los primeros 25 serogrupos de esta especie. Este esquema también se aplica en la clasificación serológica de *C. coli* y *C. lari* <sup>60, 61, 62, 63, 70</sup>. Aunque los métodos fenotípicos siguen siendo usados con propósitos epidemiológicos, es necesario advertir que si bien estos métodos son adecuados para la prospección a gran escala, tienen bajo poder de discriminación. Por ello, en los últimos años, y de la mano con el desarrollo de nuevas técnicas moleculares aplicables al seguimiento epidemiológico, se está prefiriendo el uso de algunas de estas técnicas para estos efectos. Entre las técnicas de mayor uso, aplicables a *Campylobacter* están *fla* RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) que se basa en la amplificación del gen que codifica la flagelina A (*flaA*), RAPD (*random amplification of polymorphic DNA*), ERIC-PCR (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*), PFGE (*pulse field gel electrophoresis*) y MLST (*multilocus sequence typing*) <sup>98, 100, 101</sup>.

### ***Campylobacter jejuni***

Actualmente se reconocen dos subespecies: *C. jejuni* subsp. *jejuni* y *C. jejuni* subsp. *doylei*, como unidades taxonómicas independientes dentro de esta especie.

### *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei*

Inicialmente fueron denominados como GCLO-2 (*Gastric Campylobacter-like organisms type 2*). Estos bacilos gram negativos, curvos o espiralados presentan, también, un único flagelo en uno o ambos extremos. Son microaerófilos y desarrollan lentamente entre 35 °C y 37 °C, temperatura óptima de crecimiento. Algunas cepas pueden crecer pobremente a 30 °C y a 42 °C. No reducen nitratos a nitritos, característica que les es distintiva.

Han sido aislados del epitelio de la región del antro gástrico en pacientes con úlcera gástrica o gastritis crónica activa y de niños con diarrea aguda.

Tanto la significación clínica como su frecuencia de aislamiento y sus mecanismos de patogenicidad no están claramente definidos <sup>19, 39, 69</sup>.

### *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*

Esta es la subespecie del género aislada con mayor frecuencia, tanto de animales como del propio ser humano. Por esto y por ser la más estudiada y difundida, se utilizará, de aquí en adelante, la denominación de *C. jejuni* para designarla.

#### Características morfológicas

Son bacilos gram negativos curvos, espiralados o en forma de S itálica, que presentan un único flagelo en uno o en ambos polos que le confieren una

típica movilidad con giros sobre su propio eje. Miden 1,5 a 3,4  $\mu\text{m}$  de longitud por 0,2 a 0,4  $\mu\text{m}$  de ancho. No presentan esporas pero, en cultivos de varios días degeneran a formas cocoides o esféricas que han perdido su viabilidad <sup>22</sup>, 32, 46, 90, 97 .

### Características de crecimiento

Son microorganismos de crecimiento relativamente lento y se desarrollan bien en medios que contengan peptona y extracto de levadura. Son quimioorganótrofos, no utilizan los hidratos de carbono y obtienen su energía de los aminoácidos y de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos que no sean hidratos de carbono. Su metabolismo es exclusivamente respiratorio. Sin embargo, el oxígeno, a la concentración en que se encuentra en la atmósfera normal (20-21%) les es tóxico y para su desarrollo necesitan una concentración del 5-10%. El mecanismo de toxicidad del oxígeno para *Campylobacter* sería similar al descrito para las bacterias anaerobias y estaría ligado a la acumulación de peróxido de hidrógeno y de radicales superóxido que inhiben su crecimiento. Estas bacterias poseen una catalasa y una superóxido dismutasa, pero en cantidades limitadas que no le permiten la neutralización de los peróxidos y radicales superóxido presentes en los medios de cultivo y solamente son suficientes para neutralizar los radicales acumulados intracelularmente. La adición de sulfato ferroso, metabisulfito de sodio y piruvato de sodio (suplemento FBP) a los medios de cultivo prevendría la formación de peróxidos y de radicales superóxido reduciendo la toxicidad del



oxígeno para estos microorganismos. La luz aumenta la concentración de estos elementos por lo que se recomienda no exponer los medios de cultivo a su acción <sup>6, 13, 22, 32, 46, 50, 86, 121</sup>.

Las especies termotolerantes de *Campylobacter* crecen mejor a 42-43 °C que a 37 °C. La temperatura más alta, además de favorecer su desarrollo, actúa como un factor adicional de inhibición de la microbiota acompañante. El período de incubación ideal es de 48 h <sup>22, 32, 46, 97</sup>.

Las colonias de *Campylobacter* son grisáceas o de un leve tinte rosado, no hemolíticas, planas o discretamente convexas y brillantes, con tendencia a difundirse a lo largo de la estría de inoculación y, a veces, a producir zonas de confluencia del cultivo. Muchas cepas presentan una franca diseminación por la superficie del medio formando un velo, especialmente cuando el medio de cultivo es fresco y posee bastante humedad. A medida que ésta se va perdiendo, las colonias crecen cada vez más separadas y convexas. En cultivos de 24 h, las colonias son transparentes, semejando gotas de agua diseminadas por la superficie del medio. A medida que aumenta el tiempo de incubación, aumenta también la consistencia de las colonias las cuales van adquiriendo una coloración parduzca. Con cierta frecuencia aparecen colonias que presentan un brillo metálico superficial, semejante al observado en cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* <sup>22, 32, 46, 97</sup>.

#### Mecanismos de patogenicidad

*C. jejuni* es un microorganismo enteropatogénico que, eventualmente, puede invadir la circulación causando infecciones en diferentes órganos. La

infección intestinal se localiza en el intestino delgado o en el intestino grueso donde la bacteria, luego de adherirse, se instala y prolifera. Esta bacteria no posee fimbrias pero, se ha demostrado que el flagelo y el lipopolisacárido (LPS) actúan como adhesinas que le permiten la adherencia a la célula epitelial y al mucus intestinal. La forma típica curvo-espinalada y su movimiento típico en “tirabuzón o sacacorchos” como también la atracción quimiotáctica que ejerce el mucus intestinal sobre la bacteria, facilitan el contacto de la bacteria con el epitelio del intestino. La adherencia puede ser inhibida experimentalmente con anticuerpos antflagelo. Recientemente se ha demostrado en *Campylobacter* la presencia de un sistema de secreción de tipo IV, el cual tendría participación en los mecanismos de adherencia <sup>1, 15, 17, 55, 56, 65, 74</sup>.

A través de un mecanismo de invasión tisular es capaz de generar diarrea exudativa, con presencia de mucus y sangre y ulceración intestinal. Las células invadidas se encuentran inflamadas y adquieren forma redondeada, lo que indica que se producen cambios en los reguladores del transporte de hierro, probablemente por la producción de citotoxinas o hemolisinas. Tanto en biopsias de tejido intestinal humano como de modelos experimentales en animales se ha observado invasión tisular, con similares características patológicas además de necrosis epitelial e infiltración por neutrófilos y monocitos. La capacidad invasora puede ser estudiada en el laboratorio utilizando diferentes líneas celulares como HeLa, HEp-2, INT 407 o CaCo-2 <sup>15, 47, 65, 74, 122, 126, 128</sup>.

En otros pacientes, la manifestación principal corresponde a una diarrea acuosa, semejante a la producida por bacterias enterotoxigénicas. De hecho, se describió en *C. jejuni* la producción de citotoxinas y/o enterotoxinas.

Además, a la citotoxina denominada toxina citoletal distensora (*cytolethal distending toxin*, CDT) se le asigna una importancia singular en la patogénesis de la gastroenteritis ya que bloquea la división celular al detener la transición G1/S o G2/M del ciclo celular, según el tipo de célula. Esta toxina es producida, además, por algunas otras especies como *C. lari*, *C. fetus*, *C. coli* y *C. upsaliensis*. La toxina CDT se caracteriza por producir elongación y distensión celular y, finalmente, la muerte celular. También se ha demostrado que puede inducir la liberación de interleucina-8 (IL-8) de las células epiteliales intestinales, facilitando el proceso inflamatorio y posiblemente el proceso de invasión celular <sup>4, 18,25,129, 131</sup>.

La diarrea causada por *C. jejuni* puede desencadenarse tanto por los mecanismos de adherencia, de invasión, de producción de toxinas y/o por la participación de otros factores como la movilidad, la quimiotaxis y la adquisición de hierro <sup>18, 32, 46, 65, 72, 74, 90, 97, 128</sup>.

### ***Campylobacter coli***

Esta especie es muy semejante a *C. jejuni*, razón por la cual muchos autores usan el término *C. jejuni/coli* para referirse, indistintamente, a estas dos especies bacterianas. Ambas especies se diferencian bioquímicamente por la hidrólisis del hipurato que es positiva para *C. jejuni* y negativa para *C. coli*. No existen grandes diferencias entre ambas especies en relación a su patogenicidad, composición antigénica, bacteriología y características epidemiológicas relacionadas con los mecanismos de transmisión y distribución

en animales y en el medio ambiente, salvo que *C. coli* reconoce como su principal reservorio natural al cerdo. En los países desarrollados, *C. coli* es responsable del 3 al 12% de los casos de diarrea producidos por las especies termotolerantes del género. En los países en vías de desarrollo esta frecuencia puede llegar hasta el 25% <sup>32, 33, 46, 72, 97, 128, 133</sup> .

### ***Campylobacter lari***

Esta especie fue denominada inicialmente NARTC (*nalidixic acid resistant thermophilic Campylobacter*) y después, *C. laridis*. Actualmente se denomina *C. lari* y es reconocida como agente de diarrea y septicemia en el hombre. Aún cuando su frecuencia de aislamiento es menor que la de *C. coli*, esta bacteria ha sido responsable de importantes brotes de diarrea producidos por la ingestión de agua contaminada. Los reservorios más preponderantes de esta especie son las aves marinas, particularmente las gaviotas. También se puede aislar de otros animales como perros y terneros <sup>32, 33, 46, 87, 93, 97, 127, 133</sup> .

### **Otras especies de *Campylobacter* aisladas del hombre**

#### *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*

Esta es la especie tipo del género y se aísla de varias especies de animales. Es capaz de producir aborto esporádico en el ganado bovino y ovino. Para el hombre es considerada un patógeno oportunista por su capacidad de

producir infecciones en pacientes inmunocomprometidos. Su participación etiológica en la diarrea es escasa; es más importante como agente de infecciones sistémicas. La presentación clínica más frecuente es la septicemia, la que a veces se puede presentar como una bacteriemia simple. Excepcionalmente puede participar en infecciones supurativas localizadas, tales como artritis, pleuritis o abscesos subcutáneos, las cuales pueden ser el foco primario de diseminación sistémica.

A diferencia de las especies termotolerantes, salvo raras excepciones, las cepas de *C. fetus* subsp. *fetus* no crecen a 42-43 °C y deben ser cultivadas a 37 °C. También pueden crecer a 26 °C, característica que se utiliza para su identificación<sup>2, 28, 32, 46, 69, 77, 90, 133</sup>.

### *Campylobacter hyointestinalis*

Esta bacteria, que originalmente fue aislada de cerdos con ileítis proliferativa, ha sido aislada también del contenido intestinal de bovinos y hamsters. En el hombre se ha encontrado en asociación con diarrea y proctitis en homosexuales. *C. hyointestinalis* también se aisló de casos de diarrea en adultos y niños inmunocompetentes e inmunocomprometidos<sup>26, 69, 89, 90</sup>.

### *Campylobacter upsaliensis*

Esta especie fue aislada inicialmente en 1983 a partir de perros con y sin diarrea y presentaba como principales características fenotípicas su capacidad

de crecer a 37 °C y a 42 °C y una débil o nula producción de catalasa. Por esta última característica fueron denominadas CNW (*catalase-negative* o *weakly positive group*). Estas bacterias también han sido aisladas de la materia fecal de gatos. En el hombre se han encontrado produciendo diarrea y bacteremia en niños y adultos inmunocompetentes, así como también en pacientes inmunocomprometidos. Aún no se conocen sus mecanismos de patogenicidad, pero se ha demostrado su capacidad de adhesión a células de origen endotelial. No se conoce la frecuencia real de aislamiento a partir de procesos infecciosos del hombre, como tampoco su distribución ecológica en diferentes países y en animales. Ello, en parte, se debe a que la mayoría de las cepas, además de ser de crecimiento lento, son sensibles a los antibióticos incluidos en los medios selectivos para *Campylobacter*, particularmente las cefalosporinas. La filtración de suspensiones fecales a través de membranas de 0,45 µm se recomienda para su aislamiento.

Muchos autores consideran que esta especie es un patógeno emergente que en el futuro deberá ser pesquisado ya sea como patógeno primario o como patógeno oportunista <sup>7, 14, 46, 69, 68, 90, 91, 130</sup>.

### *Campylobacter concisus*

Hasta hace poco tiempo, esta bacteria sólo había sido aislada de la cavidad oral de pacientes que presentaban gingivitis y enfermedad periodontal. Sin embargo, también ha sido aislada de las heces de pacientes con gastroenteritis. El rol de *C. concisus* en la patogenia de las infecciones periodontales y entéricas, incluyendo colitis ulcerosa, aún no está bien definido

aunque cada vez se asocia con mayor frecuencia a estas patologías. Esta bacteria, además de microaerobiosis, necesita H<sub>2</sub> para su crecimiento <sup>57, 66, 67, 69, 90, 94</sup>.

### **Diagnóstico bacteriológico. Aislamiento e identificación**

Para el aislamiento a partir de materia fecal, tanto de pacientes con diarrea como de hospederos normales, rutinariamente se busca solamente la presencia de *C. jejuni* y *C. coli*, aunque se debe tener presente que existen otras especies del género que también producen diarrea <sup>32, 46, 69, 72, 90, 133</sup>.

En general, se siembra solamente un medio selectivo. Los más comunes contienen agar sangre y una mezcla de antibióticos que inhibe la microbiota acompañante y selecciona *Campylobacter*. Sin embargo, se debe hacer notar que el uso de más de un medio selectivo mejora el diagnóstico. Los medios más utilizados son los de Skirrow, Skirrow modificado, Butzler, CCDA (*charcoal, cefoperazone, desoxycolate agar*), Campy-BAP y Preston. Muchos de estos medios contenían cicloheximida como inhibidor de hongos, pero, dado su carácter oncogénico, ha sido reemplazada por la anfotericina B. Los medios de enriquecimiento no suelen ser necesarios en casos de diarrea ya que los individuos enfermos excretan grandes cantidades de bacterias (10<sup>6</sup> -10<sup>9</sup> por gramo de materia fecal). Sin embargo, en aquellas muestras en las que *a priori* se sospecha de un bajo número de células viables, como ocurre en pacientes convalecientes, con síndrome de Guillain Barré o manipuladores de alimentos, se aconseja el uso de un medio de enriquecimiento <sup>6, 13, 32, 46, 85, 86, 90, 97</sup>.

En pacientes inmunocomprometidos con diarrea, con síntoma de sepsis o a pedido especial del médico tratante, se puede adicionar una siembra por filtración para el aislamiento de especies no termófilas de *Campylobacter*. El desarrollo de técnicas de filtración sobre agar sangre, con filtros de 0,45 µm que permiten el pasaje de estas bacterias de diámetro pequeño, pero que retienen las de mayor tamaño como las de la microbiota entérica, ha representado un avance significativo en términos de diagnosticar una mayor diversidad de especies de *Campylobacter*<sup>3, 39, 41, 80</sup>.

### Toma de muestra

La muestra de heces debe ser tomada con hisopo y sumergida en el medio de transporte Cary Blair o Amies, cuyo rendimiento para la recuperación de *Campylobacter* spp. es superior al medio de Stuart y a otros. En el caso de utilizar el medio de Stuart se debe calentar antes (como se hace con el caldo tioglicolato), para que se genere atmósfera libre de oxígeno en profundidad.

A menos que se conozca el período transcurrido entre la toma y la recepción de la muestra en el laboratorio, no se deben aceptar heces frescas en frasco estéril con tapa a rosca porque, en la realidad de la práctica hospitalaria, es dispar el tiempo que transcurre entre que se toma la muestra y se procesa.

Se deben sembrar todas las muestras. No se debe hacer un *screening* o tamizaje de siembra basándose en la presencia o no de leucocitos en el



examen directo o en la prueba de sangre oculta, porque se pierden casos positivos<sup>32, 46, 97</sup>.

### Examen microscópico directo

Este es un examen presuntivo que tiene un valor predictivo superior al 80%. Las muestras de deposiciones pueden ser examinadas a través de un examen en fresco, preferentemente en microscopio de contraste de fases, para la búsqueda de leucocitos y formas bacilares curvas y espiraladas que presenten una movilidad activa con movimientos en espiral o en forma de sacacorchos.

También puede realizarse una coloración de Giemsa, una coloración de Gram con carbolfucsina o fucsina básica como contracolorante o una coloración de Hucker. La visualización de formas bacteriana curvas, espiraladas o en “alas de gaviota”, acompañadas o no de elementos inflamatorios establece el diagnóstico presuntivo<sup>16, 33, 102</sup>.

Al observar formas bacterianas semejantes a *Campylobacter*, el microbiólogo puede realizar un informe preliminar indicando: “se observan formas bacilares curvas, en alas de gaviota, compatibles con *Campylobacter*”.

### Cultivo

Los coprocultivos se siembran en un medio selectivo, a elección del laboratorio. Muchos centros de diagnóstico utilizan el medio de Skirrow

modificado por el agregado de cefalotina y vancomicina. No obstante, la cefoperazona o el aztreonam le otorgan mayor poder selectivo que la cefalotina. También suele agregarse el suplemento FBP (sulfato ferroso, metabisulfito de sodio y piruvato de sodio al 0,5% c/u). Este suplemento destruye y previene la formación de peróxido de hidrógeno y de radicales superóxido en las placas de medio de cultivo, nocivos para *Campylobacter*. Por ello, se dice que “aumenta la aerotolerancia” de *C. jejuni* y de *C. coli*, aunque inhibe otras especies del género como *C. fetus*<sup>6, 50, 86</sup>. El agregado de vancomicina permite, además, el aislamiento adicional de enterococos resistentes a este antibiótico, de interés para laboratorios que efectúan la vigilancia de portación fecal de este patógeno.

Considerando que estas bacterias son de crecimiento relativamente lento, la incubación se realiza por 48 h, a una temperatura más elevada (42 °C - 43 °C) y en una jarra con un generador comercial específico para microaerobiosis o con una mezcla de gases (en jarras que permitan el intercambio gaseoso). Cuando se usan medios selectivos con FBP se puede incubar en jarra con vela ya que este suplemento podría aumentar alrededor de diez veces la “aerotolerancia” de *C. jejuni* y *C. coli*. Éste puede ser un método recomendable para trabajo asistencial hospitalario cuando hay pocas muestras y no se quiere gastar un generador que es costoso, o bien no se dispone de jarra y/o generador. Sin embargo, se debe tener en cuenta que, con este sistema, podrían perderse aislamientos de *Campylobacter* en algunos casos que de otra manera podrían ser positivos<sup>83</sup>.

En el caso de pacientes inmunocomprometidos, se puede mejorar el aislamiento sembrando, por filtración sobre agar sangre o agar chocolate. Para

ello se coloca sobre la superficie de la placa un filtro estéril de 0,45 µm o 0,60 µm de diámetro de poro y se depositan sobre el filtro entre 200 y 400 µL de una suspensión de la muestra fecal en solución fisiológica o caldo. Se deja filtrar a temperatura ambiente o en estufa a 37°C por 30 min o hasta que el inóculo se seque. Se puede reinocular con la suspensión para mejorar el rendimiento. Una vez que la suspensión ha filtrado, se retira asépticamente el filtro y las placas se incuban en microaerobiosis y, de ser posible, con el agregado de 3 a 7% de hidrógeno a la mezcla ya que algunas especies de *Campylobacter* lo requieren para crecer. La incubación se realiza a 37°C hasta 96 h, revisando los cultivos a las 48 h. *C. jejuni* y *C. coli* pueden ser aislados con este sistema, aunque no está claro si con él mejoran los rendimientos de los cultivos de materia fecal para estas dos especies. El sistema de filtración permite el hallazgo de las especies de *Campylobacter* atípicas y de este modo mejora los diagnósticos e incluso puede abrir nuevas líneas de investigación. También es un método muy útil para separar estos gérmenes de la microbiota acompañante en las placas<sup>3,</sup>  
39, 41, 46, 80

En los casos de enfermedad extraintestinal, el aislamiento a partir de muestras provenientes de compartimientos estériles no requiere de medios selectivos, aunque pueden ser necesarios tiempos de incubación tan prolongados como de dos semanas en microaerobiosis, ya que se debe pensar en la posibilidad de infección por *Campylobacter* atípicos, especialmente en huéspedes inmunocomprometidos. En el caso de hemocultivos, si se utiliza un método automatizado, conviene inocular un frasco anaeróbico y otro aeróbico, ya que algunas especies crecen mejor en uno que otro (*C. fetus* crece mejor en frasco anaeróbico y *C. jejuni* y *C. coli* en frasco aeróbico)<sup>43, 81, 114</sup>.

## Identificación presuntiva

Se realiza por las características de las colonias, la morfología microscópica y las pruebas de la catalasa y la oxidasa.

Las colonias visibles habitualmente aparecen en los medios en 24 h a 42 °C-43 °C, y en 48 h a 37 °C para *C. jejuni* y *C. coli*. En ocasiones el crecimiento tiene lugar luego de 72-96 horas de incubación, especialmente para las especies atípicas.

Las especies termófilas de *Campylobacter* pueden crecer formando diferentes tipos de colonias. Pueden ser planas, no hemolíticas, de aspecto mucoso, grisáceas o de un leve tinte rosado. Son de bordes irregulares y tienden a diseminarse a lo largo de la estría de incubación. Muchas veces pueden aparecer incoloras, semejando gotas de agua, o pueden crecer formando colonias enteras, convexas, brillantes y de 1 a 2 mm de diámetro<sup>32, 46, 97</sup>.

De toda colonia sospechosa se debe realizar un examen en fresco en campo claro (400X), observando las formas características espiraladas, curvas o en alas de gaviota con movimientos en espiral, o rotación alrededor de su eje. Mejor resolución que la observación en fresco en campo claro tiene la microscopía de contraste de fases o de campo oscuro<sup>40</sup>. En caso de dudas, se puede colocar una gota de aceite sobre el cubreobjetos y mirar a 100X o realizar una coloración de Gram dejando la fucsina más tiempo. Una alternativa para ver muy bien la forma es realizar una coloración con cristal violeta (fijar, colorear 3 minutos y lavar). De este modo se observarán las formas típicas.

## Pruebas de la catalasa y la oxidasa

Ambas pruebas son positivas cuando se utiliza un inóculo abundante. Para la oxidasa se pueden realizar, indistintamente, la prueba de la citocromo oxidasa o de la indofenol oxidasa. La prueba de la catalasa se puede utilizar en portaobjetos y si es negativa, se repite en tubo capilar <sup>46</sup>.

Las pruebas anteriores permiten establecer que la bacteria aislada corresponde a alguna especie del género *Campylobacter* y es necesario, posteriormente, realizar la identificación definitiva.

### Identificación definitiva

La identificación de estas bacterias se basa en sus características morfológicas y sus propiedades bioquímicas y de crecimiento (Tabla 2). Una vez confirmado el diagnóstico de *Campylobacter*, para identificar la especie, se deben realizar las pruebas de la hidrólisis del hipurato, crecimiento en TSI, producción de SH<sub>2</sub>, producción de DNasa, desarrollo a distintas temperaturas, sensibilidad al ácido nalidíxico y a la cefalotina.

La capacidad de hidrolizar el hipurato distingue a *C. jejuni* de otras especies, aunque una minoría de las cepas de esta especie pueden dar negativa esta prueba <sup>32, 46, 97</sup>.

Con esta misma finalidad, se han introducido métodos comerciales como la galería de pruebas fenotípicas de identificación API Campy (BioMérieux) y

las pruebas de aglutinación en lámina que utilizan partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos contra los tipos serológicos más frecuentes.

**Tabla 2.** Pruebas de identificación de especies del género *Campylobacter*

PRUEBA	<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	<i>C. hyointestinalis</i>	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>C. concisus</i>
Catalasa	+	+	+	V	+	+	d/-	-
Reducción de nitratos	+	+	+	-	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S	-	+	+/-	-	-	+	-	+
Requerimiento de H <sub>2</sub>	-	V	-	-	-	-	-	+
Hidrólisis de hipurato	-	-	+	V	-	-	-	-
Indoxilacetato	-	-	+	+	+	-	+	-
Crecimiento a 25 °C	+	+	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a 30 °C	+	+	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a 37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a 42 °C	-	V	+	-	+	+	V	V
Ácido nalidíxico	R	R	S	S	S	R	R	R
Cefalotina	S	S	R	S	R	R	V	R

d: reacción débil, V: variable, R: resistente, S: sensible

La presencia de cepas con fenotipos atípicos, incapaces de hidrolizar el hipurato, genera un problema en la diferenciación entre *C. jejuni* y *C. coli*, lo que provoca que la identificación basada en esta prueba no sea confiable. Eventualmente, este problema podría minimizarse con la utilización del sistema

API Campy, ya que los resultados son analizados por un *software* que se basa en todas las pruebas estudiadas y así genera un resultado más acertado.

Una alternativa de gran utilidad es el uso de espectrógrafos de masa (MALDI-TOF MS, Vitek MS)<sup>7a</sup> que permiten la identificación rápida de *C jejuni* y *C coli* de un modo fácil y seguro<sup>111a</sup>.

Diferentes pruebas moleculares, en especial la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se están utilizando también para la identificación de estos microorganismos tanto a partir de sus cultivos como para su detección directa a partir de heces humanas. También se han utilizado métodos inmunoenzimáticos e inmunocromatográficos para estos efectos <sup>3, 31, 46, 62, 70, 78, 99, 106</sup>.

### **Sensibilidad a los antibióticos**

Las infecciones intestinales por *Campylobacter* generalmente son autolimitadas y curan espontáneamente, lo que limita el uso de antimicrobianos. Cuando es necesario indicar tratamiento, el antibiótico de elección es la eritromicina u otro macrólido como la azitromicina, especialmente en niños. Para adultos, si se dispone del antibiograma y si resulta sensible, se recomienda también la ciprofloxacina. Otra alternativa es el uso de nitrofuranos.

La terapia antimicrobiana está recomendada cuando el diagnóstico es precoz ya que está comprobado que disminuyen los síntomas y se acortan los

días de enfermedad o en pacientes que presenten uno o más de los siguientes signos o condiciones:

- fiebre alta y persistente
- diarrea con sangre persistente
- más de ocho evacuaciones en 24 h
- síntomas que persisten por más de una semana
- bacteriemia
- paciente inmunocomprometido
- embarazo

Como en muchos países, incluyendo también países latinoamericanos, se ha demostrado la existencia de cepas resistentes a eritromicina y a altos niveles de fluoroquinolonas, es conveniente determinar el perfil de sensibilidad de la cepa aislada. Esta resistencia se observó tanto en cepas de origen humano como en cepas provenientes de reservorios animales.

En las infecciones sistémicas, además de la ciprofloxacina, se utilizan como agentes terapéuticos a los aminoglucósidos, especialmente gentamicina, o bien ampicilina + ácido clavulánico, tetraciclinas o carbapenemes. En infecciones por *C. fetus* se puede usar ceftriaxona, no así en las producidas por *C. jejuni* o *C. coli*.

Han sido aisladas cepas resistentes a cloranfenicol, ampicilina y tetraciclinas en diferentes países del mundo.

La resistencia a eritromicina está asociada a modificaciones ribosomales mediadas por metilación enzimática o por mutación puntual en el ARNr 23S y/o en las proteínas ribosomales L4 o L22. La resistencia a tetraciclinas y al



cloranfenicol es de origen plasmídico y la resistencia a ampicilina se debe a la producción de una  $\beta$ -lactamasa codificada en el cromosoma. La resistencia a ciprofloxacina se debe a mutaciones en la ADN girasa A, que producen resistencia cruzada con otras quinolonas <sup>17, 38, 45, 49, 51, 72, 82, 96, 109, 113, 116</sup>.

Tres métodos para establecer la concentración inhibitoria mínima en *Campylobacter* han sido propuestos y validados. Estos métodos son la microdilución en caldo, la dilución en agar y el método epsilómetro (E-test y similares) <sup>92, 133</sup>. En el año 2006, el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) aprobó un método de microdilución en caldo y un método de difusión con discos para el estudio del comportamiento de *Campylobacter* frente a los antimicrobianos y lo actualizó en 2010 y en 2015 <sup>9</sup>. Sin embargo, al usar el método de difusión con discos para eritromicina y ciprofloxacina, se deben tener precauciones ya que se han detectado inconsistencias cuando este método ha sido comparado con el método de dilución en agar <sup>73</sup>.

El método de difusión con discos se efectúa utilizando agar Mueller Hinton con 5% sangre de carnero, incubando 48 h a 36 °C-37 °C o 24 h a 42 °C en microaerobiosis: 10% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 85% de N<sub>2</sub> (mezcla de gases o sobres con generador).

Se prueban rutinariamente discos de eritromicina (15 µg), ciprofloxacina (5 µg) y, en adultos, también tetraciclina (30 µg).

El método de microdilución se realiza con caldo Mueller Hinton adicionado de 2,5 – 5% de sangre equina lisada. La incubación se efectúa en atmósfera microaeróbica a 36 °C-37 °C durante 48 h o a 42 °C durante 24 h.

El resultado de sensibilidad a azitromicina puede ser extrapolado del de eritromicina.

Con fines taxonómicos se pueden probar discos de ácido nalidíxico (30 µg) y cefalotina (30 µg).

Es muy importante que las placas deban estar bien secas antes de usar, debido a que la existencia de agua de condensación provoca que *Campylobacter* expanda sus colonias a semejanza de *Proteus*, lo que dificulta la lectura del halo de inhibición. No se deben colocar más de cuatro discos por placa.

**Tabla 3.** Criterios de interpretación para las pruebas de sensibilidad por difusión y microdilución para *Campylobacter jejuni/coli* según el CLSI<sup>9</sup>

Antibiótico	Criterio de interpretación para difusión Diámetro (mm)			Criterio de interpretación para microdilución CIM (µg/ml)		
	S	I	R	S	I	R
Eritromicina	≥ 16	13 - 15	≤ 12	≤ 8	16	≥ 32
Ciprofloxacina	≥ 24	21 - 23	≤ 20	≤ 1	2	≥ 4
Tetraciclina	≥ 26	23 - 25	≤ 22	≤ 4	8	≥ 16

### **Género *Arcobacter***

El género *Arcobacter* (del latín: *arcus*, arco y del griego: *bacter*, bacteria) fue propuesto en 1991 para agrupar bacterias que, por presentar características semejantes, fueron consideradas previamente como pertenecientes al género *Campylobacter*. Sin embargo, estudios realizados con el ADN y el ARNr de estas bacterias demostraron que no tenían relaciones

genotípicas con las especies de *Campylobacter*, por lo que se aconsejó la creación de este nuevo género <sup>11, 22, 46, 69, 117, 125</sup>.

Está formado por bacilos gram negativos curvos, helicoidales o con forma de S, no esporulados, que miden de 0,2 a 0,6 µm de diámetro por 1 a 3 µm de longitud. Son móviles por flagelación monótrica o anfítrica y crecen entre 5 y 37 °C. Los 30 °C son su temperatura óptima de crecimiento. Algunas cepas pueden crecer también a 42 °C. Conviene efectuar el aislamiento primario de estas bacterias en microaerobiosis aunque, en los subcultivos posteriores, pueden crecer en condiciones aeróbicas <sup>11, 22, 46, 69, 117, 125</sup>.

Actualmente, este género comprende 22 especies. De ellas, solo cuatro han sido aisladas del ser humano: *A. butzleri*, *A. cryarophilus*, *A. skirrowii* y *A. thereius*. *A. butzleri* es la más frecuentemente aislada, tanto de muestras humanas, animales, de alimentos o ambientales <sup>11, 46, 69, 117, 125</sup>.

Para el aislamiento de las cuatro especies de *Arcobacter* asociadas a procesos infecciosos en el ser humano se han propuesto varios métodos sin existir un protocolo universalmente aceptado. Sin embargo, existe consenso que para su aislamiento es necesario utilizar un medio de enriquecimiento con posterior resiembra a medio sólido selectivo o bien utilizar la filtración pasiva luego del enriquecimiento <sup>11, 36, 42, 60</sup>.

Para su identificación se pueden usar pruebas fenotípicas, las cuales no tienen gran poder de discriminación y solo son útiles para una identificación preliminar o presuntiva (Tabla 4). Actualmente, se recomienda que, luego de la identificación fenotípica inicial, se realice la identificación definitiva por métodos moleculares <sup>11, 23</sup>.

### ***Arcobacter nitrofrigilis***

Es la especie tipo del género y fue descrita en 1983 como *Campylobacter nitrofrigilis*, luego de ser aislada en asociación con las raíces de plantas originarias de pantanos salinos. Es la única especie fijadora de nitrógeno de la familia *Campylobacteraceae*. Hasta la fecha no se registran casos de infección humana ni animal por microorganismos de esta especie <sup>22,</sup>

11, 69

### ***Arcobacter cryaerophilus***

Las primeras descripciones de esta especie fueron realizadas en 1985 y se la denominó *Campylobacter cryaerophila*, por su capacidad de crecer en aerobiosis y a temperaturas inferiores a 37 °C. Ha sido aislada de fetos abortados de porcinos, bovinos, ovinos y equinos, del lavado prepucial de bovinos, de leche de vacas con mastitis y de riñones de perros. También ha sido encontrada en la materia fecal de bovinos, cerdos y primates. En el ser humano, *A. cryaerophilus* ha sido aislado, de las heces de pacientes con diarrea y también del torrente sanguíneo. Sin embargo su significación clínica aún no ha sido totalmente esclarecida <sup>11, 69, 84, 117, 125</sup>. En América del Sur aún no han sido reportados procesos infecciosos en humanos. Sin embargo ha sido aislado de leche, de carne de ave, de mariscos, de diversos animales y de cursos de agua naturales <sup>21, 37, 52, 108</sup>.

## ***Arcobacter butzleri***

Esta especie fue descrita en 1991 como *Campylobacter butzleri* y ha sido aislada de deposiciones diarreicas de origen humano y animal. Es capaz de crecer en aerobiosis entre los 15 °C y los 36 °C y presenta desarrollo en agar MacConkey luego del aislamiento primario. *A. butzleri* ha sido aislada de aguas, de mariscos, de alimentos cárnicos, de fetos abortados de bovinos y porcinos, de heces de aves y animales domésticos y de vida libre, de primates y de personas con diarrea. En seres humanos también fue encontrado en hemocultivos y en el contenido peritoneal de pacientes con apendicitis aguda. Esta especie es considerada la cuarta campilobacteria en frecuencia de aislamiento en heces diarreicas. A pesar de haber sido aislada en asociación con varias entidades clínicas y de haberse descrito varios mecanismos de virulencia, su verdadero rol patogénico aún continúa en estudio<sup>24, 34, 36, 37, 42, 63, 84, 108, 111, 125</sup>.

Por su aislamiento cada vez más frecuente desde cuadros infecciosos en seres humanos, su extenso reservorio animal y su frecuente aislamiento de agua y de alimentos, se le considera un patógeno emergente, zoonótico y de transmisión alimentaria<sup>60, 71, 107</sup>.

Dada la creciente importancia de *A. butzleri* como agente de infecciones transmitidas por alimentos, existe gran interés por la aplicación y desarrollo de métodos de detección e identificación de ésta y de otras especies del género, basados en biología molecular. También se han desarrollado métodos de tipificación molecular que permitirían esclarecer su epidemiología<sup>19, 23, 54</sup>.

### ***Arcobacter skirrowii***

Esta especie fue descrita en 1992 y es de baja frecuencia de aislamiento. Ha sido aislada de conejos, de prepucio de toros, de fetos abortados de bovinos, ovinos y porcinos como también de deposiciones diarreicas de estos animales. También ha sido aislada de aves, de alimentos de origen animal, de mariscos y de agua. Aunque esta bacteria ha sido aislada de diarrea en seres humanos, su significación clínica para los animales y eventualmente para el ser humano no está totalmente definida. Los aspectos epidemiológicos relacionados con ella tampoco han sido suficientemente estudiados <sup>12, 29, 58, 104, 105, 115, 120, 134</sup>.

### ***Arcobacter thereius***

Esta especie corresponde a bacilos gram negativos curvos, de 2,5 µm de longitud por 0,5 µm diámetro. No crece a 37 °C en aerobiosis pero sí lo hace a 25 °C y 30 °C en esta atmósfera. Al igual que *A. butzleri*, puede presentar crecimiento en agar MacConkey. Ha sido aislada de riñón e hígado de fetos porcinos abortados y se reportó su participación en la generación de aborto en cerdos. Ha sido descrito como agente de diarrea en el ser humano aunque se lo aísla en baja frecuencia <sup>11, 46, 123</sup>.

## Bibliografía

1. Andrews E, Fernández H, Folch H, Eller G, Pollette M. Evidencias de la participación de epítopes flagelares de *Campylobacter jejuni* en la adhesión celular *in vitro*. Medicina (B. Aires). 1996; 56:487- 92.
2. Bagilet D, Notario R, Busnelli L, Bertoletti F. Aneurisma femoral infectado por *Campylobacter fetus*. Med Clin (Barc). 2001; 116:237.
3. Bessede E, Delcamp A, Sifre E, Buissonniere A, Megraud F. New methods for detection of campylobacters in stool samples in comparison to culture. J Clin Microbiol. 2011; 49: 941-4.
4. Biswas, D; Fernando U, Reiman C, Willson P, Potter A, Allan B. Effect of cytolethal distending toxin of *Campylobacter jejuni* on adhesion and internalization in cultured cells and in colonization of the chicken gut. Av Dis. 2006; 50: 586 – 93.
5. Blaser MJ, Engberg J. Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections. En: Nachamkin I, Szymanski ChM, Blaser MJ, editors. *Campylobacter*. 3<sup>rd</sup> ed. Washington D.C., ASM Press, 2008, p. 99-121.
6. Bolton FJ, Coates D: Development of a blood-free *Campylobacter* medium: screening tests on basal media and supplements, and the ability of selected supplements to facilitate aerotolerance. J Appl Microbiol. 1983; 54:115-25.
7. Bourke B, Chan VL, Sherman P. *Campylobacter upsaliensis*: Waiting in the wings. Clin Microbiol Rev. 1998; 11: 440-9.
- 7a. Branda JA, Rychert J, Burnham CA, Bythrow M, Garner OB, Ginocchio CC, Jennemann R, Lewinski MA, Manji R, Mochon AB, Procop GW, Richter SS, Sercia LF, Westblade LF, Ferraro MJ.. Multicenter validation of the VITEK ® MS vs. 2.0 MALDI-TOF mass spectrometry system for the identification of fastidious gram-negative bacteria. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;78:129-31.
8. Cawthraw SA, Lind L, Kaijser B, Newell DG. Antibodies, directed towards *Campylobacter jejuni* antigens, in sera from poultry abattoir workers. Clin Exp Immunol. 2000; 122: 55-60.

9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. Approved guideline M45, 3<sup>rd</sup> ed. CLSI, Wayne, PA, 2015.
10. Coker AO, Isokpehi RD, Thomas BN, Amisu KO, Obi CL. Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:237-44.
11. Collado L, Figueras MJ. Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clin Microbiol Rev.* 2011; 24: 174-92.
12. Collado L, Guarro J, Figueras MJ. Prevalence of *Arcobacter* in meat and shellfish. *J Food Prot.* 2009; 72: 1102-6.
13. Corry JEL, Post DE, Colin P, Laisney MJ. Culture media for the isolation of campylobacters. *Int J Food Microbiol.* 1995; 26: 43-76.
14. Couturier BA, Hale DC, Couturier MR. Association of *Campylobacter upsaliensis* with persistent bloody diarrhea. *J Clin Microbiol.* 2012; 50: 3792-4.
15. Crushell E, Harty S, Fharif F, Bourke B. Enteric *Campylobacter*: purging its secrets? *Ped Res.* 2004; 55: 3 -12.
16. Chanqueo L, García P, León E, Blu A. Evaluación de la tinción de Hucker para la búsqueda rutinaria de *Campylobacter* sp. en el estudio de un síndrome diarreico agudo. *Rev Chil Infect.* 2005; 22: 242-6.
17. Dasti JI, Gross U, Pohl S, Lugert R, Weig M, Schmidt-Ott R. Role of the plasmid-encoded *tet(O)* gene in tetracycline-resistant clinical isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Med Microbiol.* 2007; 56: 833-7.
18. Dasti JI, Tareen AM, Lugert R, Zautner AE, Gross U. *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *Int J Med Microbiol.* 2010;300: 205-11.
19. De Boer RF, Ott A, Güreña P, van Zantena E, van Belkumc A, Kooistra-Smida AMD. Detection of *Campylobacter* species and *Arcobacter butzleri* in stool samples by use of real-time multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2013; 51: 253-9.
20. De Oliveira SJ, Baetz AL, Wesley IV, Harmon KM. Classification of *Arcobacter* species isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil. *Vet Microbiol.* 1997; 57: 347-54.



21. De Oliveira SJ, Wesley IV, Baetz AL, Harmon KM, Kader IITA, de Uzeda M. *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter butzleri* isolated from preputial fluid of boars and fattening pigs in Brazil. J Vet Diagn Invest. 1999; 11: 462-4.
22. Debruyne L, Gevers D, Vandamme P. Taxonomy of the Family *Campylobacteraceae*. EN: Nachamkin I, Szymanski ChM, Blaser MJ, editors. *Campylobacter* Third Edition. Washington D.C., ASM Press, 2008, p. 3-25.
23. Doudah L, De Zutter L, Vandamme p, Houf K. Identification of five human and mammal associated *Arcobacter* species by a novel multiplex-PCR assay. J Microbiol Meth. 2010; 80: 281-6.
24. Doudah L, de Zutter L, Baré J, De Vos P, Vandamme P, Vandenberg O, Van den Abeele AM, Houf K. Occurrence of putative virulence genes in *Arcobacter* species isolated from humans and animals. J Clin Microbiol. 2012; 50: 735-41.
25. Duong Bang D, Madsen M. Cytolethal distending toxins of *Campylobacter jejuni*: genetics, structure, mode of action, epidemiology, and the role of CDT in *Campylobacter* pathogenesis source. Genome Lett. 2003; 2: 73-82.
26. Edmonds P, Patton CM, Griffin PM, Barrett TJ, Schmid GP, Baker CN, Lambert MA, Brenner DJ. *Campylobacter hyointestinalis* associated with human gastrointestinal disease in the United States. J Clin Microbiol. 1987; 25: 685-91.
27. Engberg J. Contributions to the epidemiology of *Campylobacter* infections. A review of clinical and microbiological studies. Dan Med Bull. 2006;53:361-89.
28. Epifane G, Barbon S, Sadino G, Bouchet D, Suárez ME, Mangiaterra S. Bacteriemia por *Campylobacter fetus* aislado mediante métodos convencionales de una paciente inmunocomprometida. Rev Argent Microbiol. 2007; 39: 34-7.
29. Ertas N, Dogruer Y, Gonulalan Z, Guner A, Ulger I. Prevalence of *Arcobacter* species in drinking water, spring water, and raw milk as determined by multiplex PCR. J Food Prot. 2010; 73: 2099-102.
30. Euzéby JP. List of prokaryotic names with standing in nomenclature - Genus *Campylobacter* <http://www.bacterio.cict.fr/c/campylobacter.html>

31. Ferme C, Engvall EO. Specific PCR identification and differentiation of the thermophilic campylobacters, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. J Clin Microbiol. 1999; 37: 3370-3.
32. Fernández H. Familia *Campylobacteraceae*. En: Trabulsi L, Alterthum F, editores. Microbiología 5a edición. São Paulo, Brasil, Atheneu, 2008, p. 357-62.
33. Fernández H. *Campylobacter* y campylobacteriosis: una mirada desde América del Sur. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2011; 28: 121-7.
34. Fernández H, Flores S, Inzunza F. *Arcobacter butzleri* strains isolated from different sources display adhesive capacity to epithelial cells in vitro. Acta Scientiae Vet. 2010; 38: 283-7.
35. Fernández H, García A, Villanueva MP. Serotipos de *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* en carne de ave para consumo humano y en muestras de heces de niños con diarrea. Arch Med Vet. 2005; 37: 79-81.
36. Fernández H, Krause S, Villanueva MP. *Arcobacter butzleri* an emerging enteropathogen: communication of two cases with chronic diarrhea. Braz J Microbiol. 2004; 35: 216-8.
37. Fernández H, Otth L, Wilson L, Rodríguez R, Saldivia C, Barría P. Occurrence of *Arcobacter* sp. in river water, mussels and commercial chicken livers in Southern Chile. Int J Med Microbiol. 2001; 291: 140.
38. Fernández H, Oval A. Occurrence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* biotypes and antimicrobial susceptibility in healthy dogs in Southern Chile. Acta Scientiae Vet. 2013; 41: 1100.
39. Fernández H, Rodríguez R, Barudi C, Lobos M. A case of acute diarrhea due to the emerging pathogen *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* in Southern Chile. Braz J Microbiol. 2003; 34: 52-4.
40. Fernández H, Toledo MRF, Fagundes Neto U, Trabulsi .R. Aislamiento de *Campylobacter jejuni* en niños con diarrea aguda y controles sanos. Rev Med Chil. 1984;112:238-43.
41. Fernández H, Vera F, Villanueva MP, García A. Occurrence of *Campylobacter* species in healthy well-nourished and malnourished children. Braz J Microbiol. 2008; 39:1-3.

42. Fernández H, Vera F, Villanueva MP. *Arcobacter* and *Campylobacter* species in birds and mammals from southern Chile. Arch Med Vet. 2007; 39: 163-5.
43. Fica A, Porte L, Braun S, Veas N, Pavez C, Dabanch J, Morales R. Bacteriemias e infección endovascular por *Campylobacter* spp: nuestra experiencia en un cuarto de siglo de historia. Rev Chil Infect. 2011; 28: 211-6.
44. Figueras MJ, Levican A, Collado L, Inza MI, Yustes C. *Arcobacter ellisii* sp. nov., isolated from mussels. Syst Appl Microbiol. 2011; 34: 414-8.
45. Figueroa YM, Villalobos LB, Martínez RE, Maldonado AJ, Bastardo JW. Enfermedad diarreaica aguda asociada a campilobacterias en Cumaná, Venezuela. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela. 2010; 22: 47-52.
46. Fitzgerald C, Nachamkin I. *Campylobacter* and *Arcobacter*. En: Versalovic J, Carrol KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. Manual of Clinical Microbiology, 10<sup>th</sup> Ed. ASM Press, 2011, p. 885-99.
47. Friis LM, Pin C, Pearson BM, Wells JM. *In vitro* cell culture methods for investigating *Campylobacter* invasion mechanisms. J Microbiol Met. 2005; 61: 145 – 60.
48. Frost JA, Oza AN, Thwaites RT, Rowe B. Serotyping scheme for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on direct agglutination of heat-stable antigens. J Clin Microbiol. 1998; 36:335 - 9.
49. García P, Valenzuela N, Rodríguez MV, León E, Fernández H. Susceptibilidad antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* aislado de coprocultivos en Santiago de Chile. Rev Chil Infect. 2009; 26: 511 – 4.
50. George HA, Hoffman PS, Smibert RM, Krieg NR. Improved media for growth and aerotolerance of *Campylobacter fetus*. J Clin Microbiol. 1978; 8: 36–41.
51. Giacoboni G, Cerdá R, López C. Emergencia de la resistencia antibiótica en cepas de *Campylobacter jejuni* aisladas de carne de pollo. Analecta Vet. 2001; 21: 63–7.
52. Giacoboni G, Moredo F, Tobía MB, Piazza D. Aislamiento de bacterias del género *Arcobacter* con características bioquímicas de *A. cryaerophilus* en aguas del Río de la Plata. Analecta Vet. 1997, 17: 19-21.
53. Goddard EA, Lastovica AJ, Argent AC. *Campylobacter* O:41 isolation in Guillain-Barré syndrome. Arch Dis Child. 1997; 76: 526-8.

54. González I, García T, Fernández S, Martín R. Current status on *Arcobacter* research: an update on DNA-based identification and typing methodologies. *Food Anal Meth.* 2012; 5: 956-68.
55. Grant CC, Konkel ME, Cieplak W, Tompkins LS. Role of flagella in adherence, internalization and translocation of *Campylobacter jejuni* in nonpolarized and polarized epithelial cell cultures. *Infect Immun.* 1993; 61: 1764 – 71.
56. Guerry P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol.* 2007; 15: 456–61.
57. Hess DLJ, Pettersson AM, Rijnsburger MC, Herbrink P, van den Berg HP, Ang CW. Gastroenteritis caused by *Campylobacter concisus*. *J Med Microbiol.* 2012; 61: 746-9.
58. Ho TKH, Lipman LJA, van der Graaf-van Bloois L, van Bergen M, Gaastra W. Potential routes of acquisition of *Arcobacter* species by piglets. *Vet Microbiol.* 2006; 114: 123-33.
59. Hou FQ, Sun XT, Wang GQ. Clinical manifestations of *Campylobacter jejuni* infection in adolescents and adults, and change in antibiotic resistance of the pathogen over the past 16 years. *Scand J Infect Dis.* 2012; 44: 439–43.
60. Houf K. *Arcobacter* in a food safety perspective. *Arch Lebensmittelhyg.* 2009; 60: 73-6.
61. Humphrey TJ., O'Brien S, Madsen M., *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int J Food Microbiol.* 2007; 117: 237–57.
62. Huysmans MB, Turnidge JD, Williams JH. Evaluation of API Campy in comparison with conventional methods for identification of thermophilic campylobacters. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 3345-6.
63. Jacob J, Woodward D, Feuerpfeil I, Johnson WM. Isolation of *Arcobacter butzleri* in raw water and drinking water treatment plants in Germany. *Zentralbl Hyg Umweltmed.* 1998; 201:189-98.
64. Jacobs BC, van Belkum A, Endtz HP. Guillain-Barré Syndrome and *Campylobacter* infection. En: Nachamkin I, Szymanski ChM, Blaser MJ, editors. *Campylobacter*. Third Edition. Washington D.C., ASM Press, 2008, p. 245-61.
65. Janssen R, Krogfelt KA, Cawthraw SA, van Pelt W, WagenaarJA, Owen RJ. Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: the host perspective. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21: 505-18.

66. Kaakoush NO, Mitchell HM. *Campylobacter concisus* – a new player in intestinal disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 2: 1-15.
67. Kalischuk LD, Inglis GD. Comparative genotypic and pathogenic examination of *Campylobacter concisus* isolates from diarrheic and non-diarrheic humans. *BMC Microbiol.* 2011; 11:53.
68. Labarca J, Sturgeon J, Borenstein L, Salem N, Harvey S, Lehnkering E, Reporter R, Mascola L. *Campylobacter upsaliensis*: another pathogen for consideration in the United States. *Clin Infect Dis.* 2002; 34: e59-e60.
69. Lastovica AJ, Allos BM. Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. En: Nachamkin I, Szymanski ChM, Blaser MJ, editors. *Campylobacter*. Third Edition. Washington D.C., ASM Press, 2008, p. 123-49.
70. Lawson AJ, Logan JM, O'Neill GL, Desai M, Stanley J. Large-scale survey of *Campylobacter* species in human gastroenteritis by PCR and PCR-enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 3860–4.
71. Lehner A, Tasara T, Stephan R. Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen. *Int J Food Microbiol.* 2005; 102: 127– 35.
72. Lehoursa P, Aladjidic N, Sarlanguéc J, Mégraud F. *Campylobacter* infections in children. *Arch Pédi.* 2012;19: 629-34.
73. Lehtopolku M, Kotilainen P, Puukka P, Nakari UM, Siitonen A, Eerola E, Huovinen P, Hakanena AJ. Inaccuracy of the disk diffusion method compared with the agar dilution method for susceptibility testing of *Campylobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2012; 50:52-6.
74. Lertpiriyapong K, Gamazon ER, Fenf Y, Park DS, Pang J, Botka G, Graffam ME, Zhongming G, Fox JG. *Campylobacter jejuni* type IV secretion system: roles in adaptation to deoxycholic acid, host cell adherence, invasion, and *in vivo* colonization. *PLoS ONE.* 2012; 8: e42842.
75. Levican A, Collado L, Aguilar C, Yustes C, Diéguez AL, Romalde JL, Figueras MJ. *Arcobacter bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter venerupis* sp. nov., new species isolated from shellfish. *Syst Appl Microbiol.* 2012, 35: 133-8.

76. Levican A, Collado L, Figueras MJ. *Arcobacter cloacae* sp. nov. and *Arcobacter suis* sp. nov., two new species isolated from food and sewage. *Syst Appl Microbiol.* 2013;36:22-7
77. Levy C, Mamizuka E, Zapata C, Fernández H. *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* bacteremia and pericarditis in a woman with beta-thalassemia major. *Méd Mal Infect.* 1997; 27: 1-2.
78. Linton D., R. J. Owen, J. Stanley. Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. *Res Microbiol.* 1996; 147: 707-18.
79. López C, Agostini A, Giacoboni G, Cornero F, Tellechea D, Trinidad JJ. Campilobacteriosis en una comunidad de bajos recursos de Buenos Aires, Argentina. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2003; 22: 1013-20.
80. López L, Castillo FJ, Clavel A, Rubio MC. Use of a selective medium and a membrane filter method for isolation of *Campylobacter* species from Spanish pediatric patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1998; 17: 489-92.
81. Louwen R, van Baarlen P, van Vliet AHM, van Belkum A, Hays JP, Endtz HP. *Campylobacter* bacteremia: a rare and under-reported event? *Eur J Microbiol Immunol.* 2012; 2: 76–87.
82. Luangtongkum T, Jeon B, Han J, Plummer P, Logue CM, Zhang Q. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future Microbiol.* 2009; 4: 189–200.
83. Luechtefeld, NW, Reller LB, Blaser MJ, Wang WL. Comparison of atmospheres of incubation for primary isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from animal specimens: 5% oxygen versus candle jar. *J Clin Microbiol.* 1982; 15: 53-7.
84. Mandisodza O, Burrows E, Nulsen M. *Arcobacter* species in diarrhoeal faeces from humans in New Zealand. *N Z Med J.* 2012; 125: 40-6.
85. Martin KW, Mattick KL, Harrison M, Humphrey TJ. Evaluation of selective media for *Campylobacter* isolation when cycloheximide is replaced with amphotericin B. *Lett Appl Microbiol.* 2002; 34; 124–9.
86. Martin WH, Patton CM, Morris GK, Potter ME, Puhr ND. Selective enrichment broth medium for isolation of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol.* 1983; 17:853-5.

87. Martinot M, Jaulhac B, Moog R, De Martino S, Kehrli P, Monteil H, Piemont Y. *Campylobacter lari* bacteremia. Clin Microbiol Infect. 2001; 7: 96-7.
88. McGrogan A, Madle GC, Seaman HE, de Vries CS. The epidemiology of Guillain-Barre syndrome worldwide. A systematic literature review. Neuroepidemiol. 2009; 32:150-63.
89. Minet J, Grosbois B, Megraud F. *Campylobacter hyointestinalis*: an opportunistic enteropathogen? J Clin Microbiol. 1988; 26: 2659-60.
90. Ming Mang S. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2011; 8: 669–85.
91. Modolo JR, Giuffrida RR. *Campylobacter upsaliensis* isolated from young dogs with and without diarrhea. Rev Soc Bras Med Trop. 2004; 37: 72-3.
92. Moore JE, Barton MD, Blair IS, Corcoran D, Dooley JSG, Fanning S, Kempf I, Lastovica AJ, Lowery CJ, Matsuda M, Mcdowell DA, McMahon A, Millar BC, Rao JR, Rooney PJ, Seal BS, Snelling WJ, Tolba O. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. Microbes Infect. 2006; 8: 1955–66.
93. Morris CN, Scully B, Garvey GJ. *Campylobacter lari* associated with permanent pacemaker infection and bacteremia. Clin Infect Dis. 1998; 27:220-1.
94. Mukhopadhyaya I, Thomson JM, Hansen R, Berry SH, El-Omar EM, Hold GL. Detection of *Campylobacter concisus* and other *Campylobacter* species in colonic biopsies from adults with ulcerative colitis. PLoS ONE. 2011; 6: e21490.
95. Notario R, Borda N, Gambandé T, Bermejo J, Ponessa A, Toledo V. Cepas de *Campylobacter jejuni* resistentes a quinolonas aisladas de humanos, gallinas y pollos. Medicina (B. Aires). 2011; 71: 331-5.
96. Notario R, Borda N, Gambandé T, Sutich E. Species and serovars of enteropathogenic agents associated with acute diarrhea disease in Rosario, Argentina. Rev Inst Med Trop. 1996; 38: 5 – 7.
97. Notario R, Gambandé T, Borda N. Cuatro décadas de enteritis por *Campylobacter*. La Gaceta Infect Microbiol Clin Latinoam. 2011; 1: 31-41.
98. O'Mahony E, Buckley JF, Bolton D, Whyte P, Fanning S. Molecular epidemiology of *Campylobacter* isolates from poultry production units in Southern Ireland. PLoS ONE. 2011; 6: e28490.

99. On SLW, Jordan PJ. Evaluation of 11 PCR assays for species-level identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J Clin Microbiol. 2003; 4: 330-6.
100. On SLW, McCarthy N, Miller WG, Gilpin BJ. Molecular epidemiology of *Campylobacter* species. En: Nachamkin I, Szymanski ChM, Blaser MJ, editors. *Campylobacter*. Third Edition. Washington D.C., ASM Press, 2008, p. 191-211.
101. Ono K, Kurazono T, Niwa H, Itoh K. Comparison of three methods for epidemiological typing of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. Curr Microbiol. 2003; 47: 364–71.
102. Patiño L. Estudio comparativo entre la microscopía convencional y el método de cultivo con microfiltros para la identificación del *Campylobacter* sp. en muestras fecales de pacientes del HNGAI durante el 2° semestre del 2002. [Tesis de especialista en patología clínica]. Lima: Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2002; p. 52.
103. Patton CM, Barrett TJ, Morris GK. Comparison of the Penner and Lior methods for serotyping *Campylobacter* spp. J Clin Microbiol. 1985; 22: 558-65.
104. Patyal A, Rathore RS, Mohan HV, Dhama K, Kumar A. Prevalence of *Arcobacter* spp. in humans, animals and foods of animal origin including sea food from India. Transbound Emerg Dis. 2011; 58: 402-10.
105. Pejchalova M, Dostalikova E, Slamova M, Brozkova I, Vytfrasova J. Prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. in the Czech Republic. J Food Prot. 2008; 71: 719-27.
106. Persson S, Olsen KEP. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. J Med Microbiol. 2005; 54: 1043-7.
107. Phillips CA. *Arcobacter* spp. in food: isolation, identification and control. Trends Food Sci Technol. 2001; 12: 263–75.
108. Pianta C, Thompsen Passos D, Hepp D, de Oliveira SJ. Isolation of *Arcobacter* spp. from the milk of dairy cows in Brazil. Cienc Rural. 2007; 37: 171-4.
109. Pollett S, Rocha C, Zerpa R, Patiño L, Valencia A, Camiña M, Guevara J, Lopez M, Chuquiray N, Salazar-Lindo E, Calampa C, Casapia M, Meza R, Bernal M, Tilley D, Gregory M, Maves R, Hall E, Jones F, Sofia Arriola C, Rosenbaum M, Perez J, Kasper M. *Campylobacter* antimicrobial resistance in Peru: a ten-year observational study. BMC Infect Dis. 2012, 12:193.



110. Pope JE, Krizova A, Garg AX, Thiessen-Philbrook H, Ouimet JM. *Campylobacter* reactive arthritis: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum.* 2007;37:48-55.
111. Prouzet-Mauléon V, Labadi L, Bouges N, Ménard A, Mégraud F. *Arcobacter butzleri*: underestimated enteropathogen. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 307-9.
- 111a. Reading N, Kilgariff HM, Ratnaraja N. Rapid and accurate identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates using the VITEK®MS MALDI-TOF mass spectrometry system. ECCMID, 2012, London, UK.
112. Roldán CD, Farace MI. Campylobacteriosis: una zoonosis que es necesario considerar. *Temas de Zoonosis IV. Asociación Argentina de Zoonosis.* 2008, p. 215-9.
113. Ruiz J, Marco F, Oliveira I, Vila J, Gasco J. Trends in antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp. causing traveler's diarrhea. *APMIS.* 2007; 115: 218–24.
114. Ruiz-Esquide F, Lafourcade M, Andrews E, Fernández H. Neonatal *Campylobacter coli* hemorrhagic enteritis and bacteremia. *Braz J Microbiol.* 2003; 34: 341-3.
115. Samie A, Obi CL, Barrett LJ, Powell SM, Guerrant RL. Prevalence of *Campylobacter* species, *Helicobacter pylori* and *Arcobacter* species in stool samples from the Venda region, Limpopo, South Africa: studies using molecular diagnostic methods. *J Infect.* 2007; 54:558-66.
116. Smith JL, Fratamico PM. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter*. *J Food Prot.* 2010; 73:1141–52.
117. Snelling WJ, Matsuda M, Moore JE, Dooley JSG. Under the microscope: *Arcobacter*. *Lett Appl Microbiol.* 2006; 42: 7–14.
118. Soto A, Figueroa G, Urcelay S. Tasas de infección, IgG, IgM y anticuerpos fijadores de complemento para *Campylobacter jejuni/coli* en trabajadores de plantas faenadoras de aves en Santiago, Chile. *J Vet Med B.* 1986; 33: 676–84.
119. Steele TW, Owen RJ. *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* subsp. nov., a subspecies of nitrate-negative campylobacters isolated from human clinical samples. *Int J Syst Bacteriol.* 1988; 38: 316-8.
120. Suelam A II. Isolation and identification of *Arcobacter* species recovered from rabbits in Zagazig, Egypt. *Int J Microbiol Res.* 2012; 3: 87-92.
121. Tangwatcharin P, Chanthachum S, Khopaibool P, Chambers JR, Griffiths MW. Media for the aerobic resuscitation of *Campylobacter jejuni*. *J Food Prot.* 2007; 70: 1099-109.

122. Van Alphen LB, Bleumink-Pluym NMC, Rochat KD, van Balkom BWM, Wösten MSM, van Putten JPM. Active migration into the subcellular space precedes *Campylobacter jejuni* invasion of epithelial cells. *Cel Microbiol.* 2008; 10: 53–66.
123. Van den Abeele AM, Vogelaers D, Van Hende J, Houf K. Prevalence of *Arcobacter* species among humans, Belgium, 2008–2013. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20: 1731-4
124. Van Doorn PA, Ruts L, Jacobs BC. Clinical features, pathogenesis, and treatment of Guillain-Barre syndrome. *Lancet Neurol.* 2008;7:939-50.
125. Vandenberg O, Dediste A, Houf K, Ibekwem S, Souayah H, Cadranel S, Douat N, Zissis G, Butzler JP, Vandamme P. *Arcobacter* species in humans. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10: 1863–7.
126. Velasco J, Vizcaya L, Nieves B, Pérez I. Adherencia e invasión de campilobacterias termotolerantes en células HEP-2. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2003; 22: 32-6.
127. Waldenström J, Broman T, Carlsson I, Hasselquist D, Achterberg RP, Wagenaar JA, Olsen B. Prevalence of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter coli* in different ecological guilds and taxa of migrating birds. *Appl Environ Microbiol.* 200; 68: 5911–7.
128. Wassenaar TM, Blaser MJ. Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. *Microbes Infect.* 1999; 1: 1023–33.
129. Wassenaar TM. Toxin production by *Campylobacter*. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10: 466-76.
130. Westgarth C, Nicolson L, Pinchbeck GL, Christley RM, Dawson S, Porter CJ, Birtles RJ, Williams NJ, Gaskell RM, Hart CA. Risk factors for the carriage of *Campylobacter upsaliensis* by dogs in a community in Cheshire. *Vet Rec.* 2009; 165:526-30.
131. Whitehouse CA, Balbo PB, E. Pesci C, Cottle DL, Mirabito PM, Pickett CL. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. *Infect Immun.* 1998; 66: 1934–40.
132. Wilson DJ, Gabriel E, Leatherbarrow AJ, Cheesbrough J, Gee S, Bolton E, Fox A, Fearnhead P, Hart CA, Diggle PJ. Tracing the source of campylobacteriosis. *PLoS Genet.* 2008; 4:e1000203.

133. World Health Organization. The increasing incidence of human Campylobacteriosis. Report and Proceedings of a WHO Consultation of Experts. Copenhagen. WHO/CDS/CSR/APH/2000.4; 2001.

134. Wybo I, Breynaert J, Lauwers S, Lindenburg F, Houf K. Isolation of *Arcobacter skirrowii* from a patient with chronic diarrhea. J Clin Microbiol. 2004; 42: 1851-2.

## **Apéndice IV. Medios de cultivo y pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.**

### ***Haemophilus***

#### Requerimiento de factores V y X

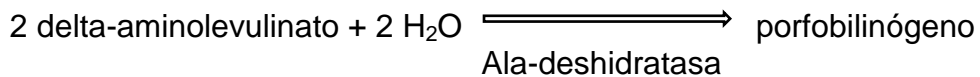
La determinación del requerimiento de factores V y X se realiza por hisopado de una placa de agar tripticasa de soja con una suspensión de una turbiedad equivalente a la del tubo N: 0,5 de la escala de McFarland del microorganismo en estudio y la colocación sobre ella de discos o tabletas comerciales impregnados con factores V, X y V+X. Se incuba a 35°C durante 18-24 horas en atmósfera de 5-10% de CO<sub>2</sub>. El patrón de crecimiento alrededor de los discos individuales en ausencia de desarrollo en el resto de la placa se usa para determinar el requerimiento de factores (Figura 1, capítulo IIc.4.1).

#### Prueba de las porfirinas

Se utiliza para determinar la dependencia de factor X. El objetivo es probar si las especies de *Haemophilus* que no requieren hemina (factor X) tienen la capacidad de sintetizar precursores del grupo hemo a partir del ácido δ-aminolevulínico (ALA).

La prueba se basa en la detección de porfobilinógeno y/o porfirinas, ambos metabolitos intermedios en la biosíntesis de hemina.

La reacción química es la siguiente:



Luego, cuatro moléculas de porfobilinógeno se combinan para formar uroporfirinógeno, que en un paso subsiguiente sufre una sustitución en sus cadenas laterales y forma coproporfirinógeno y protoporfirina IV. Esta protoporfirina es el precursor inmediato del grupo hemo.

La prueba se realiza de la siguiente manera:

Se pesa clorhidrato de ácido δ-aminolevulínico (ALA) 0,34g y MgSO<sub>4</sub> 0,0096 g en un litro de *buffer* de fosfatos 0,1 mol/l (pH = 6,9). Se dispensa en tubos a razón de 0,5 ml por tubo.

Se siembra un inóculo denso y luego de 4 horas de incubación a 35 °C, se observa la aparición de fluorescencia rojo ladrillo bajo luz UV de 360 nm de longitud de onda. Los tubos con resultados dudosos deben incubarse 24 horas. Al cabo de ese tiempo, se revela con reactivo de Kovacs, agitar y observar un color rojo en la fase acuosa inferior. Se debe incluir un tubo control negativo, sin ALA, para eliminar falsos positivos por la presencia de indol.

## ***Bordetella***

### Agar Bordet-Gengou comercial

#### *Composición*

Agar Bordet-Gengou: 30 g /l

Peptona: 10 g/l

Glicerol: 10 ml

### *Preparación*

Esterilizar en frascos con tapón de algodón con gasa. Luego, cuando el medio alcanza una temperatura soportable al tacto, agregar la sangre defibrinada de carnero o caballo (7-15%), homogeneizar y plaquear. Las placas ya preparadas con el medio suplementado con sangre son utilizables en la semana de preparadas (conservar a 4°C).

### Agar Bordet-Gengou preparado en el laboratorio

#### *Composición*

Volumen final: 3 litros

-375 g papa

-30 ml de glicerina

-16,5 g NaCl

-36 g proteosa peptona

-H<sub>2</sub>O destilada

-4,5 g Agar-agar/botella de 250 ml finales (1,8%)

#### *Preparación*

Colocar las papas peladas y cortadas en rodajas en un saco de gasa y hervir durante 30 minutos en 1,5 litros de agua con la glicerina.

Retirar del fuego, dejar enfriar para que sedimente quitando el saco con las papas.

Medir el volumen de líquido tratando de no arrastrar el sedimento y completar a 3 litros agregando el NaCl. Agregar la peptona disuelta previamente en 1 litro del mismo medio.

Esterilizar en frascos con tapón de algodón con gasa.

Luego cuando el medio alcanza una temperatura soportable al tacto, agregar la sangre desfibrinada (7-15%), homogeneizar y plaquear.

Conservar en lugares frescos, evitar la deshidratación.

#### Medio de Regan y Lowe líquido o sólido

##### *Composición en g/l*

Extracto de carne .....	10,0
Peptona de carne.....	10,0
Almidón soluble.....	10,0
Carbón activado .....	4,0
Cloruro de sodio.....	5,0
Ácido nicotínico.....	0,01
Agar.....	15,0
Cefalexina.....	0,04
Sangre desfibrinada.....	75-150 ml
pH = 7,4 +/- 0,2 a 25 ° C	

Conservar en lugares frescos, evitar la deshidratación.

## ***Brucella***

### Suero dextrosa agar (SDA)

Agar base (BBL™) 4 g, agua destilada 100 ml. Disolver en baño María y esterilizar en autoclave a 121 °C. Enfriar a 56 °C+ /-1 °C, agregar 5 ml de suero equino y dextrosa al 20% p/v esterilizados por filtración.

### Medio básico (BD)

Preparar Brucella Agar (BBL™) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y esterilizar en autoclave a 121 °C.

### Medio básico con suero equino (BDS)

Preparar medio básico estéril (BD), enfriar a 56 °C +/-1 °C y agregar suero equino descomplementado al 3% esterilizado por filtración.

### Medio de Kuzdas Morse (KM)

A 100 ml del medio básico estéril (BD) enfriado a 56 °C +/-1 °C agregar: 100 mg de cicloheximida, 25.000 UI de bacitracina y 6.000 UI de polimixina B, en soluciones esterilizadas por filtración. Previamente preparar soluciones concentradas de los antibióticos en agua destilada.

La cicloheximida se debe disolver en 1 ml de acetona antes de completar el volumen con agua destilada.



### Caldo para hemocultivos

Preparar *Brucella* Broth (BBL™) siguiendo las indicaciones del envase, agregar citrato de sodio al 2,5% y esterilizar en autoclave a 121 °C. Una vez enfriado a 56 °C +/- 1 °C colocar suero equino, descomplementado y esterilizado por filtración, al 3%. Distribuir en frascos en forma estéril, colocar tapones de goma y casquete metálico e incubarlos invertidos durante 72 h para su control.