

Libros de **Cátedra**

Patogenicidad microbiana en Medicina Veterinaria

Volumen: Bacteriología

Fabiana A. Moredo, Alejandra E. Larsen,
Nestor O. Stanchi (Coordinadores)

n
naturales

FACULTAD DE
CIENCIAS VETERINARIAS



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

PATOGENICIDAD MICROBIANA EN MEDICINA VETERINARIA

VOLUMEN: BACTERIOLOGÍA

Fabiana A. Moredo
Alejandra E. Larsen
Nestor O. Stanchi
(Coordinadores)

Facultad de Ciencias Veterinarias



A nuestras familias

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a todos los colegas docentes de la Facultad de Ciencias Veterinarias y en especial a la Universidad Nacional de La Plata por darnos esta oportunidad.

Índice

VOLUMEN 1

Bacteriología

Capítulo 1

Mecanismos de patogenicidad bacterianos

Fabiana A. Moredo y Martín Carriquiriborde _____ 6

Capítulo 2

Conceptos en Inmunología. Generalidades

Alejandra E. Larsen y Magdalena Rambeaud _____ 30

Capítulo 3

Vacunas en veterinaria

Eduardo C. Mórtola _____ 78

Capítulo 4

Bacillus anthracis

Alejandra E. Larsen y Fabiana A. Moredo _____ 91

Capítulo 5

Brucelas

Fabiana A. Moredo y Alejandra E. Larsen _____ 106

Capítulo 6

Clostridios neurotóxicos

Javier Uriarte _____ 118

Capítulo 7

ETEC

Fabiana A. Moredo _____ **131**

Capítulo 8

Estafilococos

Néstor O. Stanchi _____ **142**

Capítulo 9

Estreptococos β -hemolíticos

Emilia Bautista y María F. Gómez _____ **156**

Capítulo 10

Leptospiras

Eleatrice M Gatti _____ **174**

Capítulo 11

Moraxelas

Raúl O. Cerdá _____ **190**

Capítulo 12

Micobacterias

Gabriel Travería y Fiorella Alvarado Pinedo _____ **198**

Capítulo 13

Salmonelas

Beatriz Del Curto y Fabiana A. Moredo _____ **211**

CAPÍTULO 1

Mecanismos de patogenicidad bacterianos

Fabiana A. Moredo y Martín Carriquiriborde

La visión general de que todas las bacterias son causantes de enfermedad, en general es incorrecta. Las que pueden hacerlo se denominan “patógenas” y la capacidad de un patógeno en particular de dañar a su hospedador, “virulencia”. Si bien, cada vez se conocen más bacterias patógenas, son ínfimas con respecto a aquellas con las cuales se vive en armonía. La mayoría de los patógenos más peligrosos no forman parte de la microbiota normal.

Definiciones a tener en cuenta:

- **Patógeno:** microorganismo capaz de producir daño en el hospedador; la definición puede abarcar patógenos primarios y oportunistas; el daño en el hospedador puede ser resultado de la acción directa del microorganismo o de la respuesta inmune.
- **Patogenicidad:** capacidad de un microorganismo de ocasionar daño en el hospedador.
- **Virulencia:** capacidad relativa de un microorganismo de causar daño en el hospedador.
- **Factor de virulencia:** componente de un patógeno que ocasiona daño en el hospedador; incluye componentes esenciales para su viabilidad.

Pasos básicos de patogenia

Si bien para facilitar la comprensión del proceso infeccioso se lo divide en etapas, hay que considerar que es continuo y dinámico y no una serie de pasos definidos. Con la intención de dar claridad al proceso, será descrito en las siguientes etapas:

- adhesión
- invasión
- evasión de los mecanismos de defensa del hospedador

- multiplicación en número significativo en el sitio de la infección y/o propagación a otros sitios
- daños en el hospedador, ocasionados como consecuencia directa o indirecta de la respuesta inmune innata o adaptativa frente a la bacteria
- transmisión desde el animal infectado a otros animales susceptibles, de manera que el ciclo de infección continúe

Una vez que el microorganismo se encuentra en contacto con su hospedador, éste debe establecerse. Esto incluye la “adhesión” de la bacteria en la célula hospedadora o en componentes extracelulares, el intruso debe ser expulsado o destruido por alguno de los tantos mecanismos de defensa que normalmente entran en juego una vez que un agente extraño es detectado. Mientras esto ocurre la bacteria debe obtener, del ambiente en el cual se encuentra, los nutrientes que necesita para crecer, compitiendo por ellos con la microbiota normal. Estas actividades bacterianas, directa o indirectamente, pueden ocasionar alguna forma de daño en el hospedador o como ocurre a menudo, lo que lo ocasiona es la respuesta inmune exacerbada. En el siguiente paso, las bacterias pueden “invadir” los tejidos del hospedador causando un daño mayor. Finalmente, pueden escaparse asegurando su transmisión a otro individuo. Los medios por los cuales la bacteria lleva a cabo este proceso se denominan “factores de virulencia”.

Un inconveniente que se asocia a denominar un grupo bacteriano en particular como “patógeno”, es que no todas las cepas tienen la misma “virulencia”. Esto se debe a la presencia, o no, de “factores de virulencia” considerados importantes para que ocurra la enfermedad. Un método para cuantificar la virulencia de diferentes cepas de una misma especie bacteriana es determinar la cantidad de bacterias (dosis letal), necesarias para matar el 50 % de una población de animales susceptibles y se conoce como dosis letal 50 (DL50). Es importante remarcar, que como la virulencia o poder patógeno dentro de cepas de una misma especie puede variar, también lo puede hacer la susceptibilidad del hospedador a un microorganismo en particular. Los factores que se sabe que intervienen son edad, estado nutricional, si el individuo estuvo expuesto o no al patógeno, variedad de factores genéticos.

Si bien los factores de virulencia se dividían en cuatro grupos (adhesinas, invasinas, agresinas e impedinas), a mediados de los años '90, quedó definido en la literatura especializada, que las bacterias producen una gran cantidad y variedad de moléculas de distintas clases químicas, capaces de inducir la estimulación de células productoras de citoquinas (LPS, péptidoglicanos, ácido teicoico, lipoarabinomananos, porinas, superantígenos, lipoproteínas, exotoxinas, lípidos, ADN). Estos factores se definieron como “modulinas” y se incluyeron como la quinta clase de factores de virulencia (Tabla 1).

Una característica de muchas enfermedades infecciosas es la predictibilidad de su curso. Esto se debe a un conjunto de características que pueden observarse en el paciente y que son muy útiles para el clínico que trata de establecer lo que no está bien en ese paciente. Un microorganismo en particular, normalmente infecta un cierto tejido u órgano pudiendo limitarse sólo a ese sitio o diseminarse a través del organismo y producir un patrón característico de

destrucción o alteración tisular. Este comportamiento predecible, se debe al grupo definido de factores de virulencia que determinan el modo como ese microorganismo se adherirá a un tejido, lo invadirá y ocasionará daño.

Tabla 1.- Clasificación de los factores de virulencia bacterianos en base a su función

Factor de virulencia	Función
Adhesinas	Permiten la unión con el sustrato
Invasinas	Otorgan capacidad de invadir células y tejidos
Impedinas	Capacidad para evadir mecanismos de defensa del hospedador
Agresinas	Causan daño en el hospedador (enzimas y exotoxinas)
Modulinas	Inducen daño en el hospedador indirectamente, alterando la comunicación entre las citoquinas. Ej. LPS

Las enfermedades infecciosas de origen bacteriano, pueden clasificarse en función de los mecanismos de virulencia subyacentes, basándose en los siguientes criterios:

- sitio de acción del microorganismo.
- capacidad de la bacteria de invadir o no los tejidos y diseminarse a través del organismo.
- capacidad de la bacteria de secretar exotoxinas.
- en el caso de aquellas especies bacterianas que pueden invadir al hospedador, determinar si son de vida intra o extracelular.

Adhesión bacteriana

La habilidad que presentan las bacterias por adherirse a las células hospedadoras es un paso crucial para inducir el desarrollo de una enfermedad infecciosa. Es importante remarcar que la adhesión no debe considerarse como un hecho ocurrido entre las bacterias y las células hospedadoras de forma aleatoria o fortuita. Por lo contrario, es un proceso en el cual interactúan moléculas con alto grado de especificidad que pueden ocasionar alteraciones tanto en las bacterias como en las células hospedadoras. También debe tenerse en cuenta que para que un microorganismo se adhiera y permanezca adherido a una superficie en particular del hospedador, se deben presentar condiciones ambientales en particular.

Para que una bacteria tenga posibilidad de adhesión, los hospedadores (humanos y animales) en “estado de salud”, presentan tres tipos de superficies: piel, mucosas y dientes.

Ninguna de ellas es una estructura uniforme y cada una presenta diferentes formas que otorgan diversos tipos de sitios de adhesión y/o ambientes en los cuales las bacterias pueden sobrevivir.

Cuando las bacterias invaden tejidos más profundos, necesitan adherirse a otras células como endoteliales y células especializadas constitutivas de varios órganos o a polímeros de la matriz extracelular del tejido conectivo: proteoglicanos, colágeno, etc. La adhesión y la invasión de células endoteliales de vasos sanguíneos son esenciales para la diseminación de bacterias vía sanguínea a través del organismo. En otros casos, las bacterias pueden acceder a diferentes regiones corporales vía linfática (*M. tuberculosis*), “adhesión a” e “invasión de”, células endoteliales de vasos linfáticos.

¿Cuál es la estrategia de adhesión que tiene las bacterias?

Si bien es real que las bacterias se adhieren directamente a las células hospedadoras, en la mayoría de los casos estas superficies están recubiertas por secreciones. O sea, que los microorganismos no están en contacto directo con las células sino con las secreciones. Las bacterias quedan atrapadas y son expulsadas, las que logran mantenerse, deben rápidamente adherirse a la superficie.

Si bien una gran variedad de superficies pueden actuar como sustrato, la base molecular de este proceso es similar en todos los casos y participan fuerzas de van der Waals y cargas electrostáticas. Como la mayoría de las bacterias y superficies tienen carga negativa, se repelen. Sin embargo, estas fuerzas repulsivas disminuyen cuando se incrementan las fuerzas iónicas y en la mayoría de los ambientes naturales, la fuerza iónica es suficiente para reducir o sobre-ponerse a la repulsión. Como las bacterias se acercan a la superficie muy estrechamente, intervienen moléculas de agua que actúan como barrera de la adhesión. Sin embargo, moléculas hidrofóbicas de la superficie de las bacterias, del sustrato o ambos, pueden evitar estas moléculas de agua. La interacción hidrofóbica entre la bacteria y el sustrato puede resultar en la adhesión o puede permitir un acercamiento lo suficientemente estrecho (< 1 nm) como para que ocurran otras interacciones adhesivas. Estas incluyen las uniones de hidrógeno, puentes catiónicos o unión ligando receptor.

Estructuras bacterianas asociadas a la adhesión

Puede decirse con seguridad que todas las estructuras hasta ahora conocidas, que se encuentran en la superficie de las bacterias, están involucradas en el proceso de adhesión. Si bien la mayoría de ellas cumplen diversas funciones, hay otras cuyo único fin es la “adhesión”: pili o fimbrias. También se describieron los “curli”, no sólo median la adhesión a células epiteliales sino también a proteínas (fibrinectina y plaminógeno) del hospedador. *Salmonella* Typhimurium, produce estructuras especializadas asociadas a la adhesión, sólo bajo determinadas circunstancias y se denominan “invasomas”. La bacteria luego de permanecer 15

minutos en contacto con células epiteliales forma apéndices, muy diferentes a los flagelos o pilis, los cuales son tres veces más “adherentes” y diez veces más cortos. Los invasomas, no sólo están asociados a la adhesión sino también con la invasión y desaparecen una vez que la bacteria es internalizada por la célula hospedadora. Otras bacterias que colonizan las superficies mucosas, forman microcolonias cuya función podría ser de evasión de la respuesta inmune.

En líneas generales, los microorganismos poseen una gran cantidad de adhesinas que se expresan todas al mismo tiempo. Esto ocurre principalmente en las especies bacterianas invasivas, ya que encuentran diferentes tipo de superficies donde adherirse tanto en el inicio como en el desarrollo de la enfermedad.

Existen otras adhesinas cuya expresión se encuentra regulada por las condiciones ambientales, por lo cual, sólo se expresan bajo condiciones apropiadas durante un momento en particular ya sea en el sitio inicial de colonización o al final, en su órgano blanco.

El hecho de que las bacterias expresen una adhesina determinada en su superficie, las torna vulnerables a los mecanismos de defensa del hospedador, quien produce inmunoglobulina A (Ig A) secretora que se une a la adhesina evitando el proceso de adhesión. Para evadir este proceso, algunas bacterias evolucionaron y desarrollaron un mecanismo denominado variación antigénica o de fase.

Moléculas hospedadoras con función de receptor

Tanto humanos como animales, presentan una cantidad de tipos diferentes de superficies donde las bacterias pueden adherirse (celular, acelular, mineralizado (dientes-huesos) o inanimado). Sin embargo, la adhesión se encuentra mediada, al menos en parte, por una unión ligando-receptor. Los principales componentes de una célula son los que pueden actuar como receptores (Imagen 1).

Las bacterias pueden adherirse a las células hospedadoras de tres formas posibles: a) directamente sobre la bicapa lipídica; b) sobre moléculas receptoras de la superficie; c) indirectamente sobre moléculas del hospedador ya adheridas a las superficie celular (matriz extracelular). En la Tabla 2 se enumeran estructuras bacterianas y celulares asociadas a la adhesión.

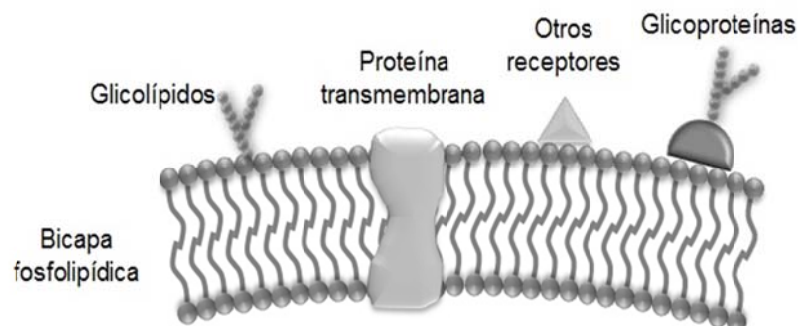


Imagen 1. Principales tipos de moléculas encontradas en la superficie de las células de los mamíferos

Una excepción son *Escherichia coli* enteropatógeno y *E. coli* enterohemorrágico. Estas bacterias tienen la capacidad de “inyectar” sobre la célula hospedadora el receptor (tir) que necesita su adhesina (intimina).

Tabla 2. Estructuras bacterianas asociadas a la adhesión

Ubicación bacteriana	Adhesina	Posibles Sustratos
Pared celular	Ácido lipoteicoico	Células epiteliales, eritrocitos
	Proteínas	Células epiteliales
	Enzimas	Células epiteliales, matriz extracelular
Membrana externa	Proteínas	Células epiteliales, macrófagos, células endoteliales
	Lipopolisacáridos	Células epiteliales, macrófagos
Cápsula	Polisacáridos	Mucina, células epiteliales, células endoteliales
Fimbrias	Proteínas	Células epiteliales

Tropismo

Algunas especies bacterianas, se adhieren, colonizan y posiblemente inducen alteraciones sólo en un tipo de tejido. Este fenómeno se denomina tropismo tisular y es de mucha ayuda para identificar al agente causante de una enfermedad infecciosa. La capacidad de un microorganismo de colonizar un tipo de tejido en particular, es la consecuencia de la acción de dos grandes fuerzas selectivas: adhesión y ambiente. La interacción entre un ligando específico con su receptor es la base de la adhesión, por consiguiente, la ausencia en un tejido de un receptor determinado hace que la bacteria no pueda adherirse y por lo tanto no hay colonización. Si bien, algunas uniones ligando-receptor son indudablemente específicas, existen receptores que están presentes en gran variedad de tejidos lo que hace posible que una bacteria pueda colonizar una diversidad mayor de estos tejidos. Hay factores ambientales que pueden contrarrestar la colonización: la piel (alta concentración de sal como consecuencia de la evaporación del sudor, escasa humedad, pH bajo debido a los ácidos grasos), difiere considerablemente de la nasofaringe (contenido de sales bajo, muy húmeda, pH neutro) permitiendo la supervivencia sólo de aquellos microorganismos adaptados a tales ambientes independientemente de la presencia de receptores apropiados para las adhesinas bacterianas.

Consecuencias de la adhesión bacteriana

La adhesión al sustrato no sólo puede inducir cambios profundos en el organismo, independientemente de la naturaleza del sustrato, sino también en las bacterias.

a) Cambios sobre las bacterias

Antes de interactuar con su hospedador, es probable que las bacterias estén expuestas a condiciones ambientales no óptimas para su desarrollo (aire, agua, suelo, vegetales). Tras su llegada a la superficie epitelial (la cual no necesariamente es su destino final), tendrá que adaptarse a vivir en el nuevo ambiente, aunque sea sólo por poco tiempo y esto requerirá la regulación y/o supresión de una gran cantidad de genes. Estos cambios, indudablemente, son inducidos por factores ambientales (pH, osmolaridad, concentración de nutrientes) aunque otros son activados por el mismo proceso de adhesión. La adhesión a células hospedadoras puede ser sólo el primer paso en la secuencia de eventos que podría implicar la invasión celular seguida por la diseminación del microorganismo a otro sitio. Es de esperar, que la adhesión bacteriana sea la señal para que el microorganismo comience a sintetizar aquellas moléculas esenciales para iniciar la invasión de las células.

b) Cambios sobre el hospedador

A nivel microscópico, la adhesión puede inducir cambios no aparentes o que las células presenten alteraciones morfológicas como ocurre con la invasión, muerte o ambas (Imagen 2).

La consecuencia de esta interacción entre bacterias y células, depende mucho de la naturaleza de ambas. Los cambios pueden inducirse en células epiteliales, fibroblastos, células endoteliales y células fagocíticas.

- Células epiteliales

Con muy pocas excepciones (tracto respiratorio inferior, vejiga y uretra), las superficies mucosas de individuos saludables, están colonizadas por bacterias. Dado que todos estos microorganismos tienen moléculas potencialmente peligrosas para las células (LPS, péptidoglicanos, ácido lipoteicoico) es notable que ninguno de los microorganismos adheridos produzca efectos sobre las células. Los residentes normales de estas superficies co-evolucionaron con su hospedador y establecieron una asociación de comensales o posiblemente mutualismo. Sin embargo, la situación es muy diferente cuando el que se adhiere es un microorganismo capaz de inducir enfermedad. La mayoría de las interacciones entre bacterias y células epiteliales involucran miembros de la microbiota normal. La adhesión no parece inducir cambios dramáticos en el comportamiento de ninguno de los dos miembros. Hasta el momento, se desconocen los mecanismos por los cuales las bacterias consideradas parte de la microbiota normal sobreviven a la acción de las proteínas y péptidos antimicrobianos (mucinas, lisozimas, lactoferrinas, lactoperoxidasas, proteínas de fase aguda,

liberación de citoquinas pro-inflamatorias). Las que inducen enfermedad, también se adhieren a las células epiteliales sin ocasionar lesión aparente. Sin embargo, mientras el proceso ocurre, las bacterias pueden producir y liberar toxinas, enzimas, etc., que son las que ocasionan el daño (*E. coli* enterotoxigénico). Básicamente pueden inducir alteraciones morfológicas, ocasionar cambios funcionales, invadir las células u ocasionarle la muerte.

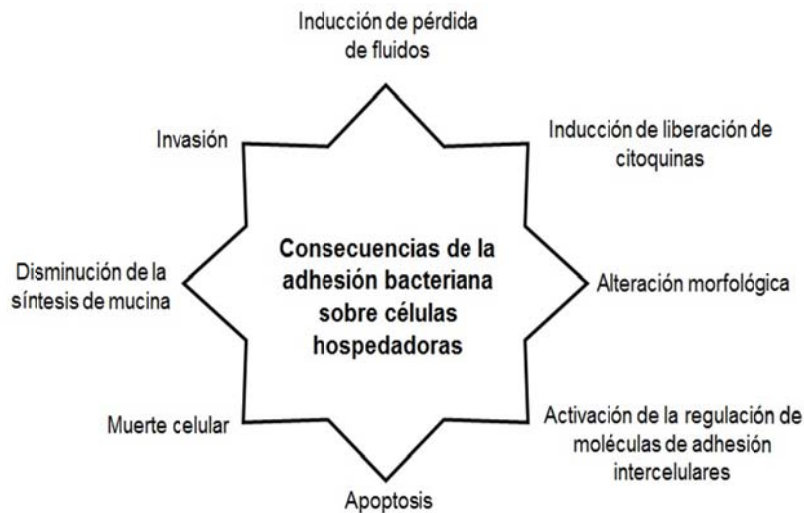


Imagen 2.- Cambios sobre las células hospedadoras ocasionados como consecuencia de la adhesión bacteriana.

- **Fibroblastos**

Son el principal componente del tejido conectivo y están vinculados a la producción del material de la matriz extracelular y al mantenimiento de la integridad del tejido. También pueden secretar citoquinas y otros mediadores de la inflamación, por lo cual son importantes dentro de las defensas del hospedador. La interferencia con sus funciones puede ocasionar alteraciones de la integridad tisular e inmunológica. Las bacterias pueden interactuar con los fibroblastos ya sea invadiendo superficies mucosas o vía soluciones de continuidad en el epitelio debido a heridas, abrasiones o quemaduras; también pueden adherirse y alterar su funcionamiento.

- **Células endoteliales**

Forman una monocapa continua que reviste la pared de los vasos sanguíneos, cuya función no sólo se restringe a ser una barrera entre la sangre y la pared de los vasos, sino también intervienen en la regulación de la tonicidad y permeabilidad vascular, coagulación de la sangre, reactivación de leucocitos y plaquetas y angiogénesis. Las células del endotelio vascular son fuente de mediadores vasculares incluyendo óxido nítrico, prostaciclina y endotelina. Con la finalidad de colonizar tejidos internos, las bacterias se adhieren a ellas y las traspasan.

- Células fagocíticas

La interacción entre algunas bacterias y las células fagocíticas (polimorfonucleares y macrófagos), constituye un aspecto interesante de la relación parásito-hospedador y demuestra que con las bacterias, todo es posible. Algunas son capaces de sobrevivir dentro de ellas. La adhesión puede ocurrir directamente (interacción adhesina-receptor) o indirectamente, interactuando con componentes del hospedador (inmunoglobulinas o complemento) que luego se unen a los receptores de los fagocitos. Cualquiera sea el mecanismo implicado, la adhesión induce la endocitosis de la bacteria dentro del fagosoma, el cual se fusiona con el lisosoma, ocasionando, normalmente, la muerte del microorganismo. La adhesión de bacterias invasoras (*S. Typhimurium*), induce la liberación de citoquinas por parte de la célula hospedadora antes de la internalización de la bacteria. Otra consecuencia posible de la adhesión bacteriana sobre fagocitos es la apoptosis. Ocurre por ejemplo con *Yersinia enterocolitica* adherida a macrófagos.

Prevención de la adhesión bacteriana

Si la adhesión es el primer paso de una enfermedad infecciosa, se deduce que bloqueando la unión bacteria-receptor, esta se previene. Las estrategias que se pueden utilizar para hacerlo son varias:

- Utilización de anticuerpos anti-adhesinas
- Receptores análogos
- Adhesinas análogas

Invasión bacteriana

Ya se mencionó que la habilidad de las bacterias para adherirse a superficies corporales (piel-mucosas) o estructuras (dientes) es un atributo de muchos microorganismos y no se limita sólo a aquellas especies que inducen enfermedad. Por eso, la colonización de superficies epiteliales por miembros de la microbiota normal es beneficiosa para el hospedador ya que lo protege de la adhesión de especies patógenas. La adhesión de bacterias no patógenas, sólo en raras ocasiones desencadena un proceso patológico, salvo que las defensas del hospedador se encuentren comprometidas.

La invasión del epitelio puede resultar en la penetración del microorganismo sólo en las capas superficiales de los tejidos como es el caso de la diarrea de los lechones, o puede involucrar una penetración más profunda, ocasionando la diseminación a través del hospedador. Esto último ocurriría vía sanguínea o linfática, o en algunos casos, puede deberse a la habilidad del microorganismo de sobrevivir dentro de fagocitos los cuales son transportados a otras partes del cuerpo. La diseminación de las bacterias hacia los tejidos que no están asociados con la puerta de entrada, es característica de muchas enfermedades como

son la meningitis y tuberculosis. Los agentes etiológicos de estas enfermedades desarrollaron un arsenal de factores de virulencia para protegerse de los mecanismos de defensa del hospedador, que comienzan a participar una vez que la barrera epitelial fue atravesada. Mientras que generalmente se asocia la invasión con franquear la barrera epitelial, el término también puede aplicarse a otros dos tipos de enfermedades infecciosas que involucran la diseminación bacteriana a través del organismo, algunos miembros de la microbiota normal de la boca pueden erosionar la superficie externa del diente (esmalte) e invadir el tejido más profundo (dentina) y, en algunas ocasiones, ganar acceso a la circulación sanguínea. Este proceso patológico (caries) es quizá, una de las enfermedades invasivas más comunes en humanos. Algunas bacterias, por ellas mismas, son incapaces de franquear el epitelio pero pueden ser introducidos dentro de las capas más profundas de los tejidos a través de artrópodos (insectos, arácnidos). También podrían considerarse como invasivas las infecciones que surgen como resultado del daño del epitelio por traumas (quemaduras, heridas, mordeduras de animales) o extracción de una pieza dentaria.

Algunos patógenos pueden emplear la digestión simple de los tejidos mediante la degradación enzimática de las moléculas de la matriz extracelular (colagenasas producidas por especies de *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*) como estrategia de invasión.

Las enfermedades infecciosas se pueden clasificar en función del tipo de vida, intra o extracelular, que adoptan las bacterias una vez atravesado el epitelio (Tabla 3). Las bacterias que viven dentro de las células hospedadoras se denominan “intracelulares obligados” (*Chlamydia* y *Rickettsia*). Las que lo hacen fuera “extracelulares” (*E. coli*, *Haemophilus*, *Mycoplasma*). “Intracelulares facultativas” (*Salmonella*, *Brucella*, *Listeria*) son las que no tienen preferencia, son capaces de hacerlo de ambas formas.

Mecanismos de invasión

Para ingresar a una célula hospedadora, las bacterias pueden adoptar una de estas dos estrategias: a) inducir cambios en el citoesqueleto de la célula y ser internalizada; b) con menor frecuencia, entrar en la célula hospedadora sin ninguna participación del citoesqueleto.

Los componentes del citoesqueleto involucrados en este proceso son los microfilamentos y los microtúbulos. Al igual de lo que ocurre con otras acciones relacionadas con proceso de invasión, dependen también del tipo de células que fue invadida.

a) Invasión de células epiteliales

Invasión con reorganización de microfilamentos

La mayoría de las bacterias invasivas, ingresan a las células epiteliales induciendo la reorganización de los microfilamentos del citoesqueleto. Su función es la de mantener la morfología de las células y juegan un papel importante en la capacidad de movimiento y división celular. Sin embargo, algunas bacterias pueden intervenir en su reorganización para

asegurarse su ingreso o adhesión. El proceso de invasión a una célula epitelial es una manipulación de las estructuras internas de la célula por parte de las bacterias (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes*). Si bien estas especies tienen en común la utilización de la reorganización de los microfilamentos como su principal estrategia de ingreso a las células epiteliales, presentan importantes diferencias en el proceso de invasión. Hay bacterias que lo hacen desde la superficie apical (*Salmonella*) mientras que otras lo hacen desde la superficie basolateral (*Yersinia* y *Shigella*).

Invasión con reorganización de microtúbulos

Los microtúbulos son estructuras dinámicas e importantes del citoesqueleto, que están en constante proceso de polimerización y despolimerización. Aunque es evidente que están involucrados en el proceso de invasión de células hospedadoras por muchas bacterias patógenas, en los mismos casos, la reorganización es un proceso crucial. Una vez que las bacterias invadieron la célula, los utilizan para desplazarse dentro de ella, para salir o para invadir células vecinas.

Con el fin de actuar como barrera física efectiva, las células epiteliales deben estar estrechamente adheridas unas a otras y esto ocurre por la presencia de moléculas como cadherinas y ocludinas. Algunas bacterias, sin embargo, pueden penetrar estas uniones y atravesar la capa epitelial pasando entre las células y no a través de ellas. Estrictamente hablando, es más una invasión de tejidos que de células. Las bacterias pueden pasar las capas de células sin afectar su viabilidad o integridad; luego, pueden quedar localizadas entre las células.

b) Invasión de células endoteliales

Una vez que las bacterias franquearon el epitelio, no son capaces de penetrar tejidos más profundos, el daño ocasionando sólo se restringe al tejido subepitelial. Sin embargo, las que son capaces de hacerlo se diseminan a través del organismo, ocasionando patologías en sitios distantes al de entrada. Para que esto ocurra deben ingresar en circulación general y atravesar otra barrera, el "endotelio". Esta capa de células de todo el sistema vascular, controla el paso de materiales incluidas las células sanguíneas dentro y fuera de la circulación.

La invasión puede ocurrir de alguna de estas cuatro formas:

- Invasión seguida de persistencia intracelular sin multiplicación
- Invasión seguida de replicación intracelular
- Traspaso sin ruptura celular
- Invasión sin fagocitosis

Consecuencias de la invasión

Al igual que ocurre con la adhesión, la invasión puede tener consecuencias tanto para la célula hospedadora como para la bacteria. Estas pueden ser difíciles de discernir o muy evidentes, ocasionando, por ejemplo, la muerte de cualquiera de las dos o de ambas.

Posibles efectos sobre la célula hospedadora

La invasión de células hospedadoras por bacterias puede afectarlas en una serie de formas que van desde apenas perceptibles hasta la muerte. En muchos casos, sin embargo, los efectos son intermedios entre ambos extremos y transitorios o permanentes, dependiendo del tipo de células involucradas, la naturaleza del microorganismo invasor y si la célula hospedadora permanece permanentemente colonizada por la bacteria o no.

- Liberación de citoquinas

Muchos tipos de células hospedadoras responden a la invasión bacteriana secretando citoquinas involucradas en la activación del sistema inmune. Sin embargo, tanto su superproducción como la liberación continua pueden tener consecuencias adversas sobre el hospedador. Las citoquinas están asociadas, directa o indirectamente con la quimiotaxis y la activación de células inflamatorias. La liberación de éstas por parte de las células epiteliales activa la respuesta inflamatoria de la mucosa como mecanismo de defensa.

- Liberación de prostaglandinas

Son otro mediador de la inflamación, liberadas por las células en respuesta a la invasión bacteriana. En efecto, la producción de diarrea como respuesta a especies enteropatógenas está mediada en parte, por prostaglandinas, particularmente E2, la cual es un importante regulador de la secreción de fluidos gastrointestinales.

- Efectos sobre la expresión de moléculas de adhesión y adhesión de neutrófilos

El epitelio intestinal no sólo constituye una barrera física sino que también participa del sistema inmune. Puede procesar y presentar antígenos así como producir componentes del sistema del complemento. Además, estas células secretan citoquinas pro-inflamatorias en respuesta a la invasión bacteriana, como señalización de la presencia de bacterias, e induce el reclutamiento de neutrófilos y fagocitos mononucleares en el sitio de invasión. La invasión de células endoteliales afecta la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1, ya sea estimulando, lo que conlleva el incremento de neutrófilos, o reprimiendo (bloquea la habilidad de migración de los neutrófilos a través del epitelio afectado).

- Muerte celular

Como consecuencia del proceso de invasión, una gran cantidad de bacterias pueden inducir la apoptosis de células epiteliales y endoteliales (ejemplo, activando captasas, consideradas componentes claves en la cascada proteolítica que termina con la apoptosis).

- Síntesis de factor tisular

El factor tisular es una proteína transmembrana producida por las células endoteliales en respuesta a una variedad de estímulos que incluyen citoquinas pro-inflamatorias y LPS. Su expresión sobre la superficie de las células endoteliales dispara la cascada de la coagulación, ocasionando la producción de fibrina que recubre las células (aumentando de este modo la adhesión bacteriana) y cualquier bacteria presente (protegiéndolas del sistema inmune). El efecto es la acumulación de bacterias sobre la pared de los vasos sanguíneos.

- Efectos sobre las bacterias

Una vez que las bacterias ingresaron en el hospedador, se encuentran en un ambiente muy distinto del cual estaban previamente, deben adaptarse a estas nuevas condiciones (temperatura, pH, osmolaridad, concentración de O₂, CO₂, macro y micro nutrientes), por lo cual se expresan genes cuyos productos son necesarios para sobrevivir y se reprimen otros. Esta condición también puede ocurrir dentro de una misma célula: citoplasma-vacuola.

Supervivencia bacteriana y crecimiento posterior a la invasión

Las bacterias que invaden una célula hospedadora terminan siendo encerradas en una vacuola. Luego, hay varios mecanismos posibles de como continúan creciendo y replicándose. Pueden hacerlo habitando la vacuola, pueden salir de ella y vivir en el citoplasma o también pueden salir de la célula y mantener una vida extracelular.

a) Intracelular

En caso de sobrevivir dentro de células no fagocíticas, las estrategias pueden ser:

Supervivencia dentro de vacuolas

Invaden las células epiteliales por endocitosis o macropinocitosis.

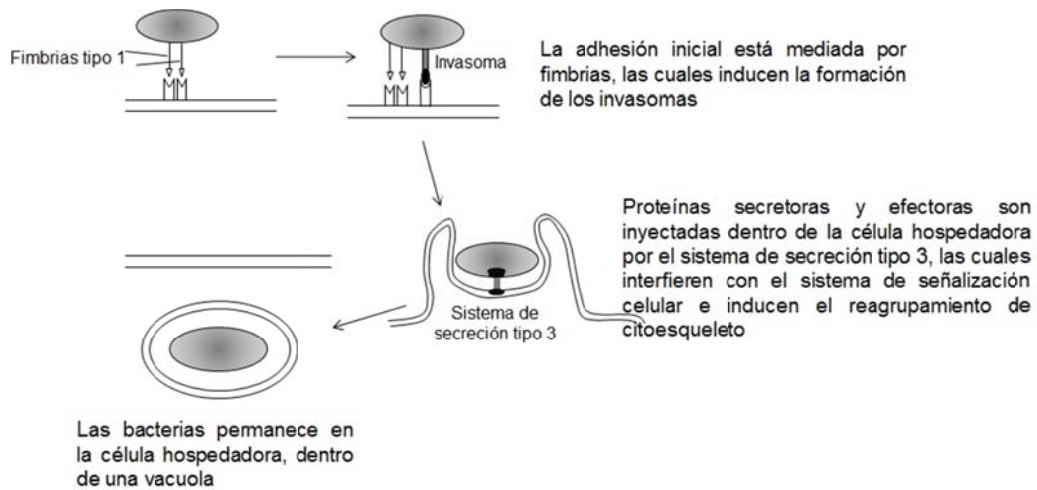


Imagen 3. Estrategia de invasión de células epiteliales de *Salmonella* spp.

Modificado de Wilson M., McNab R, Henderson B. 2002. Bacterial Disease Mechanisms, An introduction to celular microbiology. New York; Cambridge University Press

Supervivencia en el citoplasma de las células hospedadoras

Otras bacterias tienen la capacidad de escaparse de las vacuolas y colonizar el citoplasma (Imagen 4).

b) Extracelular

Hay bacterias invasoras, que luego de haber atravesado el epitelio de protección y tener acceso a los tejidos internos del hospedador, evitan la adsorción y mantienen una vida extracelular.

Luego de que las bacterias se adhieren e invaden células hospedadoras y tejidos, en muchas ocasiones se producen daños en el hospedador, directamente (alterando las funciones de las células o matándolas) o indirectamente, induciendo una respuesta inmune inapropiada (o prolongada), por ejemplo la superproducción de citoquinas pro-inflamatorias. Esto se produce de forma "inintencionada" o simple como consecuencia de productos que genera la bacteria mediante procesos normales como supervivencia, crecimiento y replicación. Otra estrategia que pueden tener es la producción de "exotoxinas".

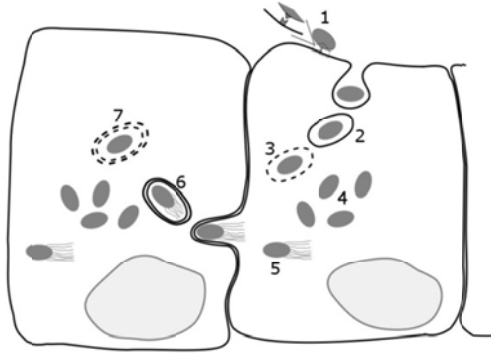


Imagen.4. Estrategia de invasión de *Listeria monocytogenes* de células no fagocíticas.

- 1.-La bacteria se adhiere a la superficie apical de la célula hospedadora. Esta acción está mediada por las proteínas internalinas A y B por parte de la bacteria y el receptor heparán sulfato celular.
- 2.- Ocorre la internalización de la bacteria vía endocitosis, quedando atrapada en una vacuola.
- 3.- Por acción de la listeriolisina O y fosfolipasa C se producen poros en la membrana de la vacuola.
- 4.- La bacteria se libera y se multiplica en el citoplasma bacteriano.
- 5.- La proteína Act A de *L. monocytogenes* dirige los filamentos de actina de la célula hospedadora hacia los extremos de la bacteria. Esta adición continua de monómeros de actina impulsa a los bacilos hacia la periferia.
- 6.- Las bacterias invaden las células vecinas quedando atrapadas en vesículas con doble membrana celular.
- 7.- Por acción de listeriolisina O y fosfolipasas la membrana de la vacuola se rompe y las bacterias quedan nuevamente liberadas para poder multiplicarse y continuar con el ciclo.

Exotoxinas bacterianas

Las exotoxinas bacterianas son una colección de proteínas responsables de muchos síntomas que son consecuencia de la acción de los patógenos durante la infección. Son exportadas activamente por las bacterias o se liberan por lisis cuando la bacteria muere. Pueden interferir en actividades celulares vitales o directamente lisislas.

Algunas bacterias producen un arsenal de toxinas; éstas incluyen las que degradan componentes de membrana celular o que forman poros en la célula hospedadora; otras interfieren con los mecanismos de defensa del hospedador; hay una variedad más específica que actúan en un sitio de acción determinado como las neurotoxinas de *Clostridium tetani* o *C. botulinum*.

Cualquiera sea su actividad, las toxinas juegan un rol esencial en el proceso infeccioso. Microorganismos comensales relativamente peligrosos pueden transformarse en virulentos a través de la adquisición de ADN extra-cromosómico que codifique la producción de exotoxinas.

Clasificación de las exotoxinas en función de su actividad

Una vez que las exotoxinas son liberadas por las bacterias, se unen a receptores específicos ubicados sobre la superficie de las células blanco, pudiendo ejercer sus efectos directamente sobre la membrana celular, como es el caso de las toxinas tipo I (actúan sobre las membranas) y tipo II (ocasionan daño en las membranas). En contraste, se encuentra la tipo III, toxinas intracelulares que ingresan a la célula hospedadora por endocitosis mediada por un receptor. Algunas son inyectadas directamente al citoplasma celular desde la bacteria por un

aparato secretor de proteínas denominado sistema de secreción tipo tres (SSTT) o sistema de secreción tipo cuatro (SSTIV)

Toxinas tipo 1 (acción sobre la membrana celular)

Las toxinas tipo I actúan desde fuera de la célula blanco, mientras que su efecto es en el interior de las mismas. Estas toxinas interfieren con las señales de traducción de la célula hospedadora, mediante una activación inapropiada de receptores celulares, ocasionando la activación o supresión de diferentes vías de señalización.

a) Familia de toxinas termoestables

Escherichia coli enterotoxigénico produce enterotoxinas que pueden dividirse en dos grandes grupos en base a su estabilidad frente al calor. Las enterotoxinas termo-estables (STs) mantienen su actividad toxigénica luego de 30 minutos a 100 °C. Todas las toxinas termoestables son pequeños péptidos. Las enterotoxinas STa y STb tienen diferentes receptores de membrana y modo de acción. La enterotoxina EAST1 (Enterotoxina termoestable 1 de *E. coli* enteroagregativo), también producida por otros patotipos de *E. coli* (enterotoxigénico, enterohemorrágico, enteropatogénico) tiene modo de acción similar a STa.

STa y EAST1 se unen y activan una guanilato ciclasa asociada a la membrana, ocasionando concentración elevada de GMPc. En contraposición, STb se une a glicosfingolípidos ubicados sobre la superficie de los enterocitos del yeyuno q abre los canales de calcio vía proteína G (Imagen 5).

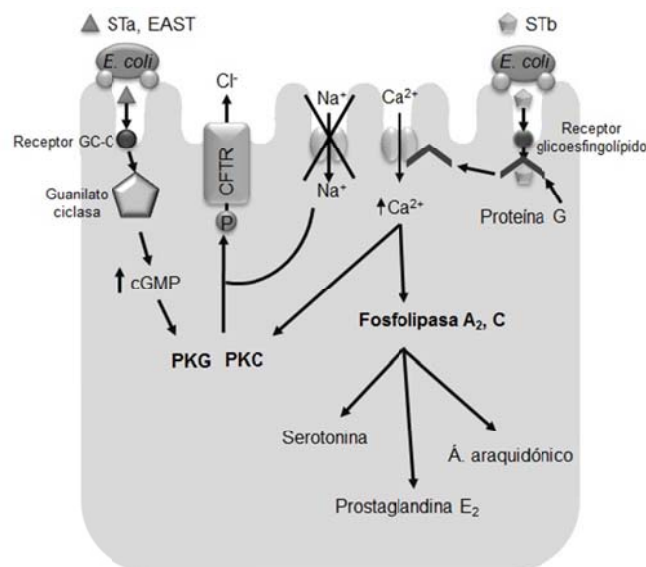


Imagen 5. Mecanismo de acción de las exotoxinas termoestables de *Escherichia coli* enterotoxigénico.

b) Superantígenos bacterianos

Los superantígenos bacterianos son una familia de proteínas funcionalmente relacionadas. Interactúan con células del sistema inmune de forma no convencional y estimulan una respuesta inmune potente actuando como mitógenos de un grupo de células T. Como resultado, las células estimuladas liberan gran cantidad de citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo IL-1, IL-6 e IL-8 y factor de necrosis tumoral, ocasionando severa respuesta inmune.

Los superantígenos se unen directamente a receptores para células T (TCR), al CMH clase 2 de las células presentadoras de antígenos (CPA), mejorando de este modo la interacción intracelular. La unión de los superantígenos en estos receptores, ocurre en el sitio donde lo hacen el resto de péptidos antigénicos, evitando así el requerimiento de ser procesadas por las CPA.

Toxinas tipo 2 (dañan la membrana celular)

a) Toxinas formadoras de poros

Estas toxinas se insertan en la membrana de la célula diana generando canales que permiten el flujo (ingreso-egreso) de pequeñas moléculas e iones y alterando el potencial de membrana. La muerte celular puede ocurrir por lisis osmótica o por apoptosis, dependiendo de las toxinas, el tamaño de los poros y el blanco celular. Adicionalmente, algunas toxinas tienen otras actividades y efectos no relacionados con la formación de poros, ejemplo: inducción de liberación de citoquinas. Hay toxinas formadoras de poros que pueden generar un poro que permite ingresar al interior de la célula hospedadora la subunidad toxigénica de la toxina (ejemplo, algunos miembros de la familia de toxinas AB) (Imagen 6). Ejemplo: citotoxina de *Moraxella bovis*, α -toxina de *Staphylococcus aureus*.

α -toxina de *Staphylococcus aureus*



Imagen 6. α -Toxina de *Staphylococcus aureus* formando poros transmembrana.

b) Toxinas que dañan las membranas celulares enzimáticamente

- Fosfolipasas: acción sobre fosfolípidos de membrana

Algunos patógenos bacterianos grampositivos y gramnegativos producen una toxina fosfolipasa C con actividad sobre los fosfolípidos de las células hospedadoras: α -toxina de

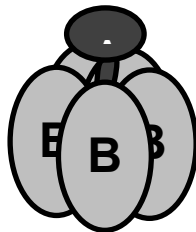
Clostridium perfringens (extremadamente potente con acción citolítica y necrótica), *Listeria monocytogenes* (importantes para la vida intracelular de la bacteria) (Imagen 4), *Pseudomonas aeruginosa* (acción sobre el surfactante) y β -hemolisina de *Staphylococcus aureus*.

- Proteasas

Las bacterias también pueden producir proteasas que actúan sobre las proteínas de membrana de las células hospedadoras.

Toxinas tipo 3 (acción intracelular)

Las toxinas tipo 3 son activas dentro de las células diana. A diferencia de las toxinas tipo I y II, necesitan ingresar al medio interno celular. Están diseñadas de tal modo que presentan una región de unión al receptor (subunidad B) y otra parte que es el componente toxigénico (subunidad A), el que debe ser trasladado al interior. Se denominan toxinas AB. El tipo de actividad que presentan las exotoxinas tipo 3 en general es: ADP-ribosiltransferasa (toxina CT de *Vibrio colera*; Exo A de *Pseudomonas aeruginosa*: inhibe la síntesis proteica, Toxina LT de *Escherichia coli* enterotoxigénico: activa la adenilciclase, elevando los niveles de AMP cíclico), N-glicosidasa (toxinas Stx₁ y Stx₂ de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga: actúa sobre el 28S ARN, bloquea la síntesis de proteínas), glucosiltransferasa (toxinas TcdA y TcdB de *Clostridium difficile*: actúan sobre las GTPasas, altera el citoesqueleto), proteasas (TeNT de *Clostridium tetani*: inhibe la liberación de neurotransmisores y LF de *Bacillus anthracis*) y adenilciclase (EF *Bacillus anthracis*).



Evasión de la respuesta inmune

Los mamíferos desarrollaron sistemas celulares y moleculares para defenderse de las infecciones microbianas. El sistema inmune y la inflamación involucran una gran cantidad de células (macrófagos, células dendríticas, linfocitos T, células endoteliales, etc.), receptores celulares (CD14, TLRs, receptores para células T), moléculas efectoras humorales (péptidos antibacterianos, componentes del sistema del complemento, proteínas de fase aguda, anticuerpos, etc.) y señales de integración (citoquinas y mediadores lipídicos como prostaglandinas y lipoxinas). En la imagen 8 se enumeran las estrategias que desarrollaron las bacterias para evadir los mecanismos de defensa del hospedador.

Evasión del sistema inmune de las superficies mucosas

Dentro de las estrategias de defensa de las superficies mucosas del hospedador frente las bacterias, se pueden mencionar la IgA, péptidos y proteínas antimicrobianas (mucina, lisozima, lactoferrina, lactoperoxidasa, proteínas de fase aguda, colectinas).

a) Evasión de IgA

Las bacterias desarrollaron diversas estrategias para inhibir la IgA de las secreciones. Una de ellas es la producción de **glicosidasas**(eliminan las cadenas laterales de carbohidratos de la IgA) **osialasas**(eliminan el ácido siálico de los oligosacáridos asociados a la inmunoglobulina); otras lo son la proteólisis de la IgA y la producción de proteínas que unen a la fracción Fc de la IgA.

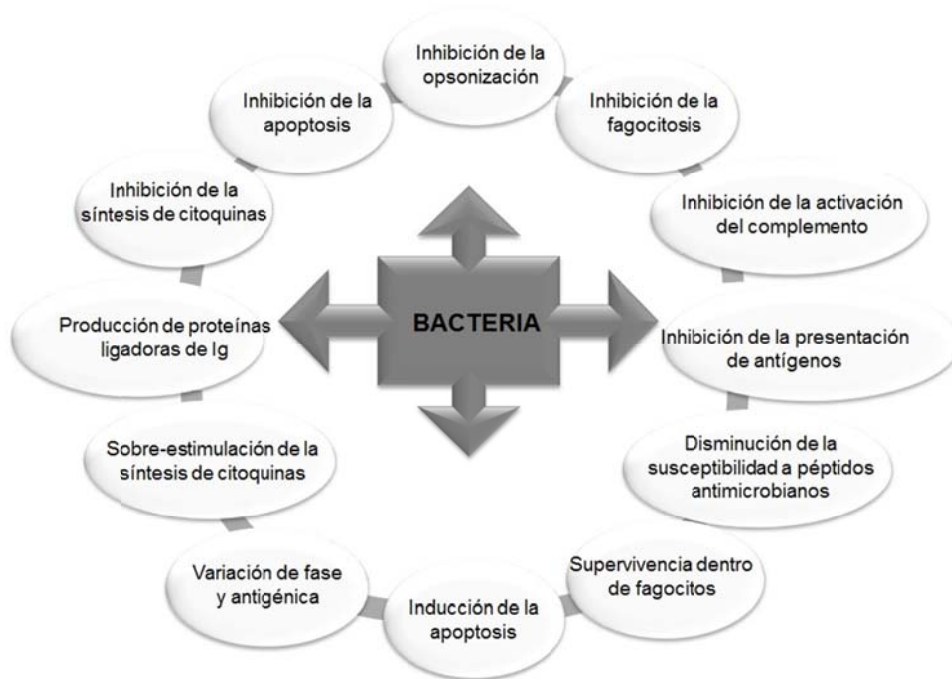


Imagen 8. Posibles estrategias utilizadas por las bacterias para evadir la respuesta inmune.

b) Evasión de péptidos antibacterianos

Las bacterias desarrollaron un gran número de proteínas cuya función es, de alguna manera, bloquear el efecto biológico de las proteínas y péptidos antimicrobianos, algunas liberan enzimas que disminuyen el pH del citoplasma de la célula hospedadora, disminuyendo la actividad de los péptidos antimicrobianos.

Evasión de citoquinas

Las infecciones bacterianas pueden causar, rápidamente, la muerte del individuo infectado. El shock séptico y el shock tóxico son dos condiciones similares, desencadenadas por bacterias gramnegativas y grampositivas respectivamente. El incremento en la producción y circulación de citoquinas pro-inflamatorias, factor de necrosis tumoral α (FNT α) e interleuquina 1- β (IL-1- β), ocasiona cambios en la fisiología cardiovascular con disminución de la presión sanguínea e inhibición de la perfusión en órganos vitales.

Hasta el momento se conoce que hay bacterias que tienen receptores para citoquinas (*E. coli*, *Shigella*, *Mycobacterium tuberculosis*) IL-1, FNT γ . La función podría ser la de inhibir las citoquinas del sitio de infección; otra función es la actuar como promotores del crecimiento bacteriano.

Mientras que algunas toxinas bacterianas tienen la capacidad de inducir la producción de citoquinas, otras pueden inhibirlas. Las proteínas bacterianas que pueden hacerlo son: a) aquellas que inhiben la producción de linfocinas IL-2, IL-4, etc.; b) las que inhiben la producción de IFN- γ ; c) las que tienen acción proteolítica sobre las citoquinas.

Evasión de la respuesta inmune innata

Los microorganismos evaden los mecanismos antibacterianos de las superficies mucosas y son capaces de manipular las citoquinas para beneficio propio. Esta habilidad tiene consecuencias tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa.

a) Evasión del sistema del complemento

Las bacterias y los virus desarrollaron estrategias para evadir el sistema del complemento (respuesta inmune innata-opsonización/fagocitosis; respuesta inmune adaptativa-producción de anticuerpos).

- **Cápsula**

La cápsula bacteriana, protege al microorganismo de la fagocitosis. En el caso de *Streptococcus agalactiae*, está constituida por residuos de ácido siálico, que previenen la activación de la vía alternativa del complemento y el consecuente depósito de C3b sobre la superficie bacteriana. En contraposición, la cápsula de *Streptococcus pyogenes* está compuesta por ácido hialurónico, que no inhibe la producción de C3b y su unión a la superficie bacteriana.

- **Proteasas y evasión del complemento**

Algunas bacterias producen proteasas capaces de inhibir las vías del sistema del complemento. *S. agalactiae*, codifica una enzima que inactiva proteolíticamente la anfilotoxina humana C5a. Esta enzima, C5a-asa, en estado soluble es neutralizada por anticuerpos IgG

presentes en el suero o plasma humanos; sin embargo, cuando se encuentra asociada a la superficie de la cápsula del estreptococo, inactiva a C5a sin ser neutralizada por la IgG. *Pseudomonas aeruginosa*, produce elastasas que inactivan C3b y C5a.

- Interferencia con proteínas que regulan el complemento

La proteína M de *S. pyogenes*, se une a la proteína reguladora del complemento proteína de unión C4 (C4BP) y al Factor H. Estas uniones le permiten a la bacteria mantener su actividad biológica y estar recubiertas por inhibidores activos del complemento, previniendo el depósito de C3b sobre la superficie bacteriana y por consiguiente bloqueando la fagocitosis del microorganismo.

b) Inhibición de la destrucción-muerte en la fagocitosis

El principal mecanismo de destrucción de bacterias invasoras es la fagocitosis (macrófagos y neutrófilos).

Las bacterias pueden inhibir las funciones de los fagocitos por diferentes vías: a) inhibición indirecta previniendo la opsonización; b) inhibición directa; c) inhibición directa por inducción de la apoptosis; d) inhibición por sobrevida dentro del fagocito.

Evasión de la respuesta inmune adaptativa

a) Evasión de anticuerpos

Los anticuerpos pueden neutralizar la acción de los factores de virulencia, producidos por las bacterias. También son necesarios en la opsonización, activación de la vía clásica del complemento y mejoran la fagocitosis. Son muy importantes dentro de los mecanismos de defensa frente a los microorganismos, es de esperar que las bacterias hayan desarrollado estrategias para evadirse de ellos.

- Proteínas bacterianas que se unen a inmunoglobulinas (IgG)

Las bacterias evolucionaron de tal manera que presentan un gran número de genes que codifican proteínas que tienen la capacidad de unir anticuerpos. La más estudiada es la proteína A producida por *Staphylococcus aureus*. Esta se encuentra anclada en la pared celular y tiene la particularidad de unirse a la fracción Fc de la IgG. La bacteria termina recubierta por anticuerpos, los cuales son incapaces de interactuar con los receptores de los fagocitos. Es una estrategia que permite inhibir la fagocitosis.

- Variación antigénica

Los anticuerpos, generalmente, reconocen moléculas que se encuentran sobre la superficie de las bacterias. Estas moléculas son antigénicas y obviamente una de las estrategias de evasión será cambiarlas. Este fenómeno ocurre con un gran número de componentes bacterianos y se conoce como “variación antigénica”.

b) Superantígenos bacterianos y evasión de la respuesta de LT

Algunas bacterias sintetizan proteínas que reconocen el dominio V β del TCR y proteínas del CMH tipo II, las cuales forman péptidos complejos y antigénicos. Las proteínas bacterianas se llaman superantígenos. El mejor estudiado es la toxina del shock tóxico (TSST) 1 que causa un shock tóxico similar al shock séptico ocasionado por bacterias Gram negativas.

Los LT pueden ser activados por tres clases diferentes de moléculas. Los antígenos, proteínas bacterianas, son normalmente el mayor estimulante de células T. Los superantígenos interactúan con el CMH clase II y algunos dominios V3 de TLR. Este proceso activa tanto a las células presentadoras de antígenos como a los LT.

Las consecuencias de la producción de superantígenos no están del todo clara. *Staphylococcus* y *Streptococcus* los producen en gran cantidad y mucha de su toxicidad puede deberse a ellos.

Control del ciclo celular y de la apoptosis

Tanto la inhibición de la división celular como la inducción del proceso de apoptosis, pueden ser utilizadas por las bacterias como estrategias para evadir los mecanismos de defensa del hospedador.

a) Inhibición bacteriana del ciclo celular

Las bacterias tienen la capacidad de producir dos tipos de sustancias que pueden interferir con el ciclo celular: a) inhibidoras de la progresión celular y b) estimuladoras de la proliferación celular. La toxina más conocida es la *Citoletal Distending Toxin* (CDT), que inhibe el ciclo de progresión celular de LT por lo que actúa como inmunosupresora. Otro ejemplo es la toxina STI de *Salmonella* Typhimurium que también inhibe la proliferación de LT.

Otras bacterias producen proteínas que pueden inducir la proliferación celular. Un ejemplo es la toxina de *Pasteurella multocida* (PMT), que actuaría desregulando la vía de diferenciación de tanto de las células mieloides como mesenquimatosas. En condiciones *in vitro* de resorción ósea, PMT es uno de los principales inductores de destrucción ósea. La principal lesión asociada a *P. multocida* en cerdos es la rinitis atrófica.

b) Control bacteriano de la apoptosis

Como estrategia de evasión de los mecanismos de defensa del hospedador, las bacterias controlan la apoptosis, pudiéndola inducir o inhibir ya sea para eliminar a los leucocitos, en el primer caso, como para sobrevivir dentro de la célula hospedadora en el segundo.

- Inducción de la apoptosis. Muchas bacterias son capaces de desencadenar el proceso de apoptosis en la célula hospedadora. La inducción resulta de una interacción compleja de proteínas bacterianas con proteínas celulares que finalmente median la apoptosis. Las bacterias son capaces de activarla a través de una gran cantidad de mecanismos, incluyendo la secreción de compuestos tales como inhibidores de la síntesis de proteínas, proteínas formadoras de poros, moléculas responsables de la activación de la maquinaria endógena de muerte en la célula infectada y superantígenos; proteínas pro-apoptóticas, ejemplo caspasas, inactivar proteínas anti-apoptóticas, ejemplo NFκB o MAP-quinasas, o aumentar la regulación de los sistemas receptores/ligandos endógenos, que inducen la apoptosis, en la superficie de la célula infectada.
- Inhibición de la apoptosis. La inhibición de la apoptosis proporciona una ventaja de supervivencia para las bacterias de vida intracelular. Los patógenos bacterianos desarrollaron varias formas de prevenir la apoptosis mediante la protección de las mitocondrias y la prevención de la liberación del citocromo c, mediante la activación de las vías de supervivencia celular o evitando la activación de la caspasa.

Referencias

- Berube BJ, Bubeck Wardenburg J. *Staphylococcus aureus* α -Toxin: Nearly a Century of Intrigue. *Toxins*.2013; 5(6):1140-66.
- Croxen MA, Finlay BB.Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity.*Nature Rev Microbiol*. 2010; 8:26-38.
- Dubreuil JD. Antibacterial and Antidiarrheal Activities of Plant Products against Enterotoxinogenic *Escherichia coli*.*Toxins*. 2013; 5:2009-41; doi:10.3390/toxins5112009.
- Faherty CS, Maurelli AT. Staying alive: bacterial inhibition of apoptosis during infection.*Trends Microbiol*. 2008; 16(4):173-80.
- Grassmé H, Jendrossek V, Gulbins E. Molecular mechanisms of bacteria induced apoptosis. *Apoptosis*.2001; 6:441.doi:10.1023/A:1012485506972
- Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO. 2010.*Pathogenesis of bacterial infections in animals*.Ames, Wiley-Blackwell.
- Lancellotti M, Carneiro Pereira RF, Gentile Cury G, de Hollanda LM.Pathogenic and Opportunistic Respiratory Bacteria-Induced Apoptosis. *Braz J Infect Dis*. 2009; 13(3):226-31.
- Mudrak B, Kuehn M. Heat-Labile Enterotoxin: Beyond GM1 Binding. *Toxins*.2010; 2:1445-70.
- Wilson M, McNab R, Henderson B. 2002. *Bacterial Disease Mechanisms, An introduction to celular microbiology*. New York; Cambridge University Press.

CAPÍTULO 2

Conceptos en Inmunología. Generalidades

Alejandra E. Larsen y Magdalena Rambeaud

La inmunidad refiere a la capacidad del hospedador en resistir la depredación por parte de microorganismos que de otro modo lo destruirían. El sistema inmune de los mamíferos es una matriz de complejos procesos bioquímicos y de contacto entre células, que permite una eficiente detección y eliminación de diferentes y numerosos patógenos que amenazan la integridad y la vida del hospedador.

La inmunidad tiene muchas facetas, pero tradicionalmente el sistema inmune se diferenció en 2 grandes subsistemas, teniendo en cuenta las diferentes funciones en defensa del hospedador, aunque interconectados, secuenciales y finalmente retroalimentados: la inmunidad innata (“inmunidad natural” o “resistencia innata”) y la inmunidad adaptativa (“inmunidad adquirida”).

En el planeta existen un inimaginable número de microorganismos: bacterias, virus, hongos y parásitos, algunos potencialmente patógenos o patógenos per se. Sin ir tan lejos, en nuestro propio cuerpo conviven más de 3000 diferentes especies de bacterias; se estima que existen 10 bacterias por cada célula de nuestro cuerpo. En convivencia con los microorganismos, el sistema inmune co-evolucionó para que ambos tipos de células convivan en armonía.

La inmunidad innata refiere al conjunto de mecanismos con los que cuenta el organismo como primera barrera de defensa frente a los microorganismos patógenos y no patógenos. Los efectores de esta inmunidad, también llamada natural o espontánea, están presentes incluso antes de tomar contacto con los microbios. Su acción es inmediata o se desencadena dentro de las 4 - 96 horas pos-contacto. Se considera inespecífica, pero co-evolucionó con los patógenos para reconocerlos a través de ciertas estructuras claves que están presentes en ellos y no en otros microorganismos pero sobre todo ausentes en el hospedador. Incluye mecanismos físicos, químicos, bioquímicos, humorales y celulares.

A diferencia de la inmunidad innata, la inmunidad adaptativa es específica. Con una exquisita capacidad de distinguir mínimas diferencias entre moléculas, sumado a la propiedad de recordar ese contacto y dejar memoria para responder en el próximo contacto de forma más rápida y eficiente. Es inducida y modulada por la respuesta inmune innata, por lo tanto tarda entre 3 o 4 días en generar efectores para combatir a los diferentes microorganismos y sus

metabolitos y están representados por los LT y B y los efectores humorales como citoquinas y anticuerpos. Se denomina adaptativa o adquirida por que las células cambian para poder reconocer mejor al microorganismo en los sucesivos contactos y adquirida para poner en relieve que la potente respuesta inmune se adquiere con la experiencia, o sea, en los sucesivos contactos con el mismo antígeno. En la tabla 1 se enumeran las diferencias más importantes entre los sistemas inmune innato y adaptativo.

Tabla 1: Características de la inmunidad innata y adaptativa

Inmunidad Innata	Inmunidad Adaptativa
Presente desde el nacimiento	Se desarrolla y mejora durante el tiempo de vida
Se mantiene inalterable durante toda la vida	Puede durar un tiempo variable o toda la vida
El contacto o exposición con microorganismos o sus productos no es esencial	El contacto o exposición con el patógeno o sus productos es esencial
Es heredable	No es heredable, salvo en un corto periodo durante la transferencia pasiva de la inmunidad
Reconoce estructuras compartidas por grupos de microorganismos. No reconoce estructuras propias	Reconoce detalles moleculares, tanto microbianos como no microbianos

La inmunidad innata presenta variados mecanismos de defensa: físicos, representados por las barreras naturales como epitelio de piel y mucosas, pelos, cilias y secreciones (saliva, lágrimas, etc.); y químicos, como el pH estomacal y las sales y lípidos de la piel, que tienen como objetivo prevenir la entrada de microorganismos, las barreras naturales a través del recambio celular en piel y mucosa, la síntesis de péptidos antimicrobianos, así como la propia microbiota normal. Otros mecanismos bioquímicos lo constituyen las proteínas de fase aguda, así como citoquinas que potencian procesos antimicrobianos llevados a cabo por las células de la inmunidad innata: neutrófilos, mastocitos, macrófagos, células naturalmente asesinas o NK (por su sigla en inglés, *Natural Killer*), linfocitos B1, linfocitos T $\gamma\delta$, células dendríticas, etc.

Los sistemas físicos y biológicos/bioquímicos están activos de forma constante y hasta lo que se sabe, no necesitan del reconocimiento de patógenos para activarse a diferencia de las células de ambos sistemas inmunes que si lo necesitan para transformarse en efectoras.

Es importante establecer que los vertebrados superiores cuentan con los dos sistemas inmunes, en cambio los organismos invertebrados, que constituyen más del 95 % de los seres multicelulares del planeta, solo poseen inmunidad innata para combatir virus, bacterias, hongos y parásitos. En el capítulo de virus de abejas, se detalla cuáles son las armas inmunológicas con las que cuenta estos insectos para defenderse de los patógenos más habituales, comparados con los de vertebrados y otros insectos más estudiados (*Drosophila* y *Anopheles*).

En este capítulo se comenzará a explorar al sistema inmune desde la puerta de entrada más común para los microorganismos, la piel y las mucosas, luego se indagará sobre los eventos que se suceden una vez que el microorganismo atraviesa estas barreras, se avanzará en los mecanismos de acción del sistema inmune innato y su importancia en la modulación y activación de la respuesta adaptativa, conoceremos las funciones efectoras de los diferentes componentes humorales y celulares.

Superficie mucosa, un pequeño recordatorio desde el punto de vista inmuno-estructural

El cuerpo de los animales está cubierto por la piel y sus faneras (pelo, uñas y otras estructuras córneas y glándulas accesorias) que conjuntamente con las mucosas que recubren los órganos huecos, los separan del medio ambiente y protegen del contacto con diversos agentes, inclusive los microorganismos. Para cumplir con esta vital función estas estructuras deben contar con una capa de protección la cual está constituida mayoritariamente por células epiteliales, cuya disposición y características darán lugar a la piel y la mucosa.

Las células epiteliales presentan diferentes formas según el órgano donde se encuentran y la función que estén desempeñando, por ej: epitelio escamoso en ciertas cavidades, epitelio columnar en órganos como estómago o intestino. Su disposición puede ser en un solo plano celular o en varias capas de células, donde toma el nombre de epitelio estratificado. Ejemplos de este tipo de epitelio es el escamoso estratificado no queratinizado de la mucosa del tracto reproductivo u oral y el epitelio queratinizado cuyo representante es la piel. La integridad y la impermeabilidad del epitelio están aseguradas por las uniones fuertes entre células, como placas de cadherinas, desmosomas y hemidesmosomas que anclan las células entre ellas y a la matriz de la lámina basal.

Acompañando a estas células se intercalan otras que tienen como función la síntesis de diferentes componentes, como son las barreras bioquímicas. Las células caliciformes sintetizan mucus, que además de humedecer y colaborar con el mantenimiento de la integridad del epitelio, tienen una función inmune muy importante ya que es la primer barrera entre el microorganismo y el epitelio, con agentes microbicidas o bacteriostáticos como péptidos antimicrobianos o inmunoglobulina (Ig) A, capaces de reconocer y neutralizar estructuras microbianas. Las células de Paneth, intercaladas entre las células epiteliales del intestino, son las responsables de sintetizar ciertos péptidos antimicrobianos. Las células estomacales producen ácido clorhídrico, potente bactericida.

Intercaladas con las células del epitelio, se encuentran los linfocitos intraepiteliales T $\gamma\delta$, capaces de reconocer células epiteliales dañadas, removerlas y favorecer la re-epitelización. La célula M, presente en intestino y pulmones, es una célula epitelial especializada con función centinela de muestreo de antígenos de la luz intestinal.

Barreras físicas de la mucosa

El epitelio que separa al animal del medio ambiente mantiene la condición de esterilidad del interior de los organismos, gracias a la gran extensión sin solución de continuidad de la piel y las mucosas evitando que penetren microorganismos, solo permitiendo el ingreso de moléculas muy pequeñas.

La piel es seca, lo que evita el crecimiento bacteriano, a esta característica se suma la concentración de sales por la evaporación del sudor y el metabolismo de los ácidos grasos del sebo, tóxico para las bacterias así como su pH bajo que entorpece el crecimiento bacteriano. Los poros, los folículos pilosos y las glándulas sebáceas presentan factores antimicrobianos (lisozima, IgA). Estas estrategias inmunes se complementan con la descamación de la piel, liberando y arrastrando consigo microorganismos adheridos. La piel se renueva casi por completo cada dos días.

Otra estrategia mecánica que posee el hospedador vertebrado para evitar la colonización de microorganismos es el fluido de líquidos, por ejemplo, el mecanismo de arrastre que ejercen el sudor, las lágrimas o saliva, favorecido por el parpadeo y la masticación en los últimos dos casos respectivamente; la orina, que al ser expulsada con cierta presión cumple la función de barrido de las vías urinarias.

En el epitelio de las vías aéreas de nasofaringe y árbol bronquial, el movimiento de fluidos es activo. Los pelos de las fosas nasales, los cornetes nasales que favorecen las turbulencias provocando que el polvo o microorganismos en suspensión, tomen contacto con el moco que cubre el epitelio. El epitelio del tracto respiratorio superior presenta prolongaciones celulares especializadas denominadas cilias que arrastran el moco hacia la orofaringe donde es tragado o escupido.

Barreras químicas y bioquímicas de la mucosa

pH

Todas las formas de vida tienen un pH óptimo de homeostasis. Los vertebrados superiores preferimos uno cercano al pH neutro (pH7); el aumento o la disminución del pH en ciertos órganos inhibe el crecimiento celular y la colonización bacteriana. El pH ácido en estómago (pH 2), vagina y piel (pH 5 en ambas) limita el crecimiento bacteriano. En los epitelios del tracto genital femenino adulto la flora normal, bacterias ácido lácticas, son responsables del pH. Ya sea por producción propia o por la colaboración de la microbiota normal, el cuerpo puede, por este simple mecanismo, limitar la colonización bacteriana.

Biomoléculas con actividad antimicrobiana

En colaboración con los mecanismos descritos existen numerosos péptidos antimicrobianos involucrados en la defensa del hospedador contra los microorganismos. Son sintetizados en forma constitutiva o inducidos cuando las células productoras reconocen patógenos específicos o son estimuladas por citoquinas específicas.

- **Mucina:** es una glicoproteína compleja que forma polímeros que se ensamblan entre sí convirtiéndose en estructuras de varios micrómetros de largo. Es un componente del moco producido por las células caliciformes. Mantiene la humedad de las mucosas, atrapa microorganismos evitando que contacten con sus receptores celulares y contiene sustancias antimicrobianas secretadas por células epiteliales.
- **Lisozima:** La lisozima es un péptido antimicrobiano que altera al peptidoglicano de la pared bacteriana, al romper los enlaces β -1,4 entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina. Las bacterias grampositivas son más sensibles a su acción, al presentar mayor cantidad de peptidoglicano en su pared. Sin embargo, se demostró la actividad moduladora de la lisozima sobre el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias gramnegativas. Actúa sinérgicamente con otros péptidos antimicrobianos potenciando su actividad bactericida. Generalmente es producida por células especializadas de las mucosas y se encuentra en lágrimas, sudor, secreción nasal.
- **Lactoferrina:** es una proteína con alta afinidad por el hierro, producida por células epiteliales y polimorfonucleares neutrófilos (PMN). El hierro es un oligoelemento esencial para la vida, por lo tanto hospedador y microorganismos co-evolucionaron para competir por él. El secuestro de hierro a partir de la lactoferrina inhibe la disponibilidad de éste para ser aprovechado por la bacteria. Por otro lado, presenta actividad antimicrobiana al unirse al lípido A del LPS y componentes de bacterias grampositivas. El clivaje proteolítico de la lactoferrina libera un péptido antimicrobiano denominado lactoferritina.
- **Lactoperoxidasa:** es una glicoproteína producida por PMN y macrófagos, pero también por células epiteliales de la mucosa. Es la responsable de la producción de componentes reactivos del oxígeno como superóxido, sustancia tóxica para los microorganismos.
- **Fosfolipasa A₂:** esta enzima altera la composición de las membranas celulares al remover ácidos grasos de fosfolípidos de membrana. Está presente en las lágrimas y en intestino, es producida por las células de Paneth. Es muy efectiva matando bacterias grampositivas.
- **Inhibidor de proteasa secretado por leucocitos (SLPI por su sigla en inglés)** inducido por el LPS y citoquinas como interleuquina 6 (IL-6) e IL-10, es secretado por leucocitos pero también por células epiteliales, interactúa e inhibe la actividad del LPS.
- **Péptidos trefoil:** familia de pequeños péptidos secretados por células caliciformes del tracto gastrointestinal. Se asocian con la mucina y cubren la superficie apical de las

células epiteliales desempeñando un papel importante en la integridad de la mucosa, reparación de lesiones y en limitar la proliferación celular.

- **Proteínas de Fase Aguda (PFA):** si bien la gran mayoría de las PFA son sintetizadas por el hígado al ser estimuladas por citoquinas pro-inflamatorias liberadas principalmente por macrófagos del foco infeccioso, se demostró *in vitro*, que las células epiteliales producen amiloide A sérico que neutraliza bacterias.
- **Colectinas:** son proteínas oligoméricas compuestas por dominio de lectina tipo C conectadas a un dominio homólogo al colágeno. Son capaces de reconocer y unirse específicamente a hidratos de carbono. Ejemplos de éstas son la lectina fijadora de manosa y proteínas surfactantes A y D, consideradas PFA. Son sintetizadas en la mayoría de las superficies mucosas y su función es reconocer hidratos de carbono sobre la superficie de diferentes microorganismos, aglutinarlos y favorecer su eliminación por fagocitosis.
- **IgA secretoria:** esta inmunoglobulina es el efector humoral de la inmunidad adaptativa capaz de atravesar el epitelio de las mucosas. Este isotipo de inmunoglobulina es sintetizado en los órganos linfáticos asociados a las mucosas como respuesta inmune efectora y de memoria frente a patógenos que logran tomar contacto con el sistema inmune adaptativo.
- **Péptidos antimicrobianos:** muchas células del organismo son capaces de producir péptidos con actividad antibacteriana. Los primeros péptidos antimicrobianos (AMP, por su sigla en inglés) fueron descubiertos en hongos y bacterias, los conocidos antibióticos. En la década del '80 fueron descubiertos en insectos y posteriormente en vertebrados superiores. La mayoría de las células de vertebrados e invertebrados producen alguna suerte de AMP. En el intestino delgado, las células de Paneth, ubicadas en las criptas de Lieberkühn, producen un gran número de compuestos antimicrobianos incluyendo lisozima, fosfolipasa A₂, así como los AMP denominados defensinas, las cuales están formadas por una secuencia de 10 a 40 aminoácidos y se clasifican según la presencia o ausencia de cisteína en su constitución. Aquellos que presentan cisteína pueden contener puentes disulfuro que estabilizan su estructura. Los AMP dañan la membrana celular de las bacterias. El colesterol presente en las membranas celulares eucariotas inhibe casi en su totalidad la acción de los AMP. Las bacterias no desarrollaron sistemas de resistencia frente a estos péptidos antibacterianos. Se demostró que el éxito en la protección de las superficies mucosas contra la colonización bacteriana, es la sumatoria de varios factores que actúan en sinergia, por ejemplo la dupla lisozima/lactoferrina o lisozima/SLPI. La síntesis de los AMP se induce por estímulo antigénico donde estructuras conservadas, son reconocidas por receptores del sistema inmune innato, activando vías de señalización que desembocan en la síntesis de efectores inmunes, así como por el estímulo de citoquinas específicas como IL-1

Microbiota normal

Desde los años '50 se conoce la habilidad que tiene la microbiota normal para inhibir la colonización por patógenos exógenos. Presenta dos mecanismos de acción: 1) el tapiz de bacterias comensales inhibe la adhesión de patógenos exógenos; 2) si estos patógenos son capaces de adherirse al epitelio se les hace difícil crecer gracias a la competencia nutricional que ejerce la microbiota normal.

Existe un fenómeno llamado interferencia bacteriana, mecanismo por el cual algunas bacterias son capaces de interferir con el crecimiento de otras secretando sustancias químicas que son antagónicas para otras bacterias (compuestos antibióticos como sulfuro de hidrogeno, ácidos grasos volátiles de cadena corta) o alteran el medio ambiente inhibiendo su desarrollo.

Células del epitelio mucoso

La mucosa está compuesta por células epiteliales y un pequeño porcentaje de células no epiteliales. Todos los epitelios que contactan con el medio exterior (epitelio del tracto respiratorio, tracto digestivo, urogenital) están conectados con el sistema inmune adaptativo subyacente. Según qué puerta de entrada de distintos patógenos estén custodiando, se lo denomina sistema inmune asociado a las mucosas (MALT, por sus sigla en inglés) que incluye al sistema inmune asociado al intestino (*Gut-ALT*) o sistema inmune asociado a la piel (*Skin-ALT*).

Células M

El epitelio que está recubriendo el GALT (del inglés *Gut associated lymphoid tissue*), presenta una población de células especializadas denominadas células M. Las células M, de membranosas o microplegadas, son células especializadas ubicadas entre las células epiteliales, se encuentran en bajo número y hasta el momento, no se definieron marcadores específicos para ellas. Son morfológicamente distintas a sus vecinas epiteliales: las microvellosidades en su cara apical multiplican el área de contacto con la luz intestinal y en su extremo basal, presentan un bolsillo donde están en estrecha relación con células de la inmunidad como macrófagos, células dendríticas y linfocitos. Su función parecería ser la de captar antígenos de la luz intestinal y translocarlos, vía endocitosis, hacia su cara baso-lateral para que sean reconocidos por los elementos linfoides presentes en las placas de Peyer. De esta manera, el sistema inmune asociado a las mucosas puede determinar la presencia de microorganismos patógenos en la luz del intestino.

Células de Paneth

Son células presentes en las criptas de Lieberkühn en el intestino delgado. Ya se comentó su función.

Linfocitos intraepiteliales

Son linfocitos pertenecientes a la inmunidad innata, su receptor difiere del de los linfocitos convencionales en la constitución y en la variabilidad de sus cadenas, por ello también se denominan linfocito T $\gamma\delta$, mientras que los LT convencionales presentan receptor de la célula T o receptor de células T conformados por cadenas $\alpha\beta$. Forman parte de un grupo de células denominado linfocitos de la inmunidad innata, agrupados por su similitud con los linfocitos de la inmunidad adaptativa aunque con funciones y características diferentes. Los LT $\gamma\delta$ tiene un repertorio limitado de TCR, sugiriendo que van evolucionado para reconocer un número limitado de antígenos más frecuentes en la luz del intestino.

Se encuentran presentes en las placas de Peyer, intercalados entre las células epiteliales y en la lámina propia de la submucosa. La proporción con respecto a las células epiteliales varía según la especie; por ejemplo en bovinos representan el 60 % de las células epiteliales intestinales. Su función es la de reconocer patógenos en la luz intestinal así como proteínas resultantes del estrés celular, remover células intestinales dañadas y promover la re-epitelización.

La mucosa como centinela

Al ser la primera barrera contra los patógenos, la mucosa tiene un rol central de defensa, con componentes físicos-químicos y bioquímicos, entre el medio ambiente y el interior del organismo. Se sabe que las células epiteliales son capaces de modular la respuesta inmune innata y adaptativa. Por un lado, las células M detectan material microbiológico de la luz intestinal y lo translocan para que pueda ser reconocido por las células de la placa de Peyer. Por otro lado, las células epiteliales presentan receptores de superficie, capaces de reconocer estructuras propias de patógenos, activarse y sintetizar citoquinas y quimioquinas que promueven una respuesta inflamatoria local. Producen quimioquinas como IL-8 que recluta neutrófilos al sitio de inflamación; la presencia de neutrófilos en la luz del intestino hace pensar en otras quimioquinas que favorecen la salida de neutrófilos, que hasta el momento no fueron identificados. Una gran incógnita hasta ahora son los mecanismos ejercidos por el sistema inmune de las mucosas para apagar la respuesta inflamatoria. Se propusieron algunos: productos de la acción enzimática de la lipooxigenasa sobre el ácido araquidónico, el mediador lipídico lipoxina A_4 . La compleja orquestación de células y citoquinas responsables de apagar un proceso inflamatorio es una de las áreas del conocimiento científico que representa un gran desafío para los inmunólogos.

Células, órganos y tejidos del sistema inmune. Ontogenia del sistema inmune

Todas las células que circulan en la sangre se producen en la médula ósea, esto incluye, eritrocitos, plaquetas, polimorfonucleares, linfocitos, monocitos, etc.

Las células del sistema inmune se organizan en tejidos y órganos, los cuales proporcionan el microambiente adecuado que favorece y potencia los procesos inmunes. Los órganos linfáticos se dividen según su función en órganos primarios y secundarios. Los primarios son aquellos donde se producen las células del sistema inmune y donde son seleccionados aquellos linfocitos capaces de no reaccionar contra lo propio, evitando que queden clones autorreactivos capaces de generar enfermedad autoinmune. En los eventos que se dan durante la ontogenia, las células ganan y pierden receptores de membrana que los identifica como células con funciones efectoras diferentes. Los LB y LT y toda la línea mieloide se originan en la médula ósea. Los LT deben además pasar por el timo, otro órgano primario donde completan su maduración. En los órganos primarios los LT y LB adquieren sus receptores de reconocimiento de antígeno específico, receptor de célula T (TCR) o receptor de célula B (BCR), respectivamente. También son consideradas órganos linfáticos primarios las placas de Peyer del íleon y la bolsa de Fabricio en aves.

Todas estas células tienen su célula progenitora única denominada célula troncal hematopoyética progenitora común, que se diferencia en células progenitoras de estirpe celular: progenitora linfocítica común y la mieloide común. En la figura 1 se detallan células y factores de crecimiento y diferenciación. Las células troncales son autorrenovables y permanecen durante toda la vida en la médula ósea.

El timo es un órgano linforreticular donde llegan los pro-linfocitos T desde la médula ósea. En este órgano los linfocitos inmaduros sufren una serie de modificaciones, comienzan proliferando mientras que pierden y ganan receptores de superficie, para concluir siendo seleccionados sólo aquellos que hayan logrado reordenar sus genes de tal manera que los TCR no sean capaces de reconocer antígenos propios, pero que sí reconozcan a los receptores encargados de presentar a los antígenos extraños denominados complejos mayores de histocompatibilidad I y II (CMH I y CMH II). Los LT se diferencian en dos subpoblaciones con funciones diferentes: los LT CD4⁺, colaboradores o *helper*, que reconocerán péptidos extraños presentados por moléculas del CMH tipo II y los LT CD8⁺ o citotóxicos, que reconocerán péptidos extraños presentados por moléculas del CMH tipo I.

Los órganos secundarios son aquellos donde los LT y LB maduros y capacitados para reconocer lo no propio se organizan estructuralmente de tal manera que optimizan los contactos intercelulares para favorecer la activación de la respuesta inmune. Los órganos linfáticos secundarios están representados por los nodos o nódulos linfáticos, el bazo y los tejidos linfáticos asociados a las mucosas. En cada órgano, los LT y LB se agrupan en zonas distintas y diferenciales para favorecer el reconocimiento de antígenos, su diferenciación y proliferación, así como la activación de la respuesta y la producción de efectores y células de

memoria. La estructura la aporta la red de células estromales y el soporte funcional lo aportan células especializadas como dendríticas foliculares, macrófagos, células NKT, etc., encargadas de modular la función inmune.

Resumiendo, todas las células que participan en la respuesta inmune se originan y se capacitan en los órganos linfáticos primarios. Las células de la línea mieloide son las pertenecientes a la inmunidad innata que patrullan el organismo por el sistema circulatorio. Algunas especializadas en el reconocimiento de patógenos (células dendríticas, macrófagos) se localizan expectantes en los tejidos, sobre todo en aquellos relacionados con las puertas de entrada naturales de los microorganismos (piel y mucosas) lugar donde se activa la respuesta inmune innata una vez instaurado el foco infeccioso.

Las células del sistema linfoide, una vez capacitadas en los órganos linfáticos primarios se dirigen y se localizan en los tejidos y órganos linfáticos secundarios donde se activa la respuesta inmune adaptativa. El producto de la activación son las células efectoras que salen de los órganos linfáticos secundarios para dirigirse a los sitios donde van a ejercer su función: las células plasmáticas productoras de anticuerpos se van a localizar en la médula ósea y los LT efectores se dirigen al foco infeccioso a ejercer sus diferentes funciones. Finalmente, la respuesta inmune deja memoria de contacto, LT y LB de memoria.

Inmunidad innata en acción

La secuencia de acciones que define a la inmunidad innata es reconocimiento, activación y síntesis de efectores. El sistema inmune evolucionó bajo una tremenda presión ejercida por los patógenos y el resultado es que todos los organismos multicelulares desarrollaron la habilidad de reconocer a los microorganismos invasores y eliminarlos sin causar daño a sí mismos.

1. Reconocimiento

Para reconocer a los patógenos, el sistema inmune cuenta con receptores que se unen a estructuras específicas de patógenos. Se sabe que existen 11 receptores encargados de esta función y que están codificados en unos pocos genes de la línea germinal. ¿Cómo se las arregló el sistema inmune innato para poder discriminar entre la gran cantidad de microorganismos existentes, sumado la capacidad de algunos para mutar, mediante tan pocos receptores de reconocimiento?. Estos receptores reconocen patrones moleculares compartidos entre grupos de patógenos y no estructuras particulares. Estos patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs (por su sigla en inglés *Pathogen-associated molecular patterns*), son estructuras conservadas, que no están sujetas a variaciones antigénicas ya que son esenciales para la patogenicidad y viabilidad del microorganismo. Ejemplo de PAMPs son el lipopolisacárido (LPS) compartido por todas las bacterias gramnegativas, el peptidoglicano de

las bacterias grampositivas o el ARN doble cadena de algunas familias virales. Ninguna de las estructuras reconocidas como PAMPs se encuentra en el hospedador, por lo cual la capacidad de discernimiento entre lo propio y no propio del sistema innato es perfecta.

Los receptores capaces de reconocer a los PAMPs están estratégicamente presentes en células de la piel y mucosas que contactan inicialmente con los patógenos durante la infección. Estos receptores se denominan Receptor de Reconocimiento de Patrones PRRs por su sigla en inglés (*Pattern Recognition Receptors*). Los PRR se pueden clasificar por su función, por su ubicación extra o intra celular, o por su ubicación dentro de diferentes compartimientos celulares. La presencia de estos receptores es particularmente abundante en un grupo de células especializadas denominadas células presentadoras de antígeno, que incluyen a las células dendríticas y macrófagos.

2. Activación

Como consecuencia de la etapa de reconocimiento se desencadena la activación que comprende dos eventos principales: 1) señalización, que sucede cuando se estimulan los receptores TLR (por su sigla en inglés *Toll-like receptor*) con la consiguiente síntesis de efectores y 2) la activación de los receptores endocíticos que desembocan en la fagocitosis. Los receptores TLR son de señal porque tienen la función de enviar una señal al interior de la célula a partir de la cual se pone en marcha diferentes vías de activación para sintetizar una gran variedad y combinación de moléculas que colaboraran con la respuesta inmune (ej: citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión, moléculas de co-estímulo, receptores de quimioquinas, enzimas, proteasas, etc.). Los receptores con función fagocítica conforman un gran grupo de diversas moléculas capaces de reconocer estructuras microbianas. Una vez producido el reconocimiento, la función es internalizar el complejo PRR endocítico/PAMPs-microorganismos e iniciar la endocitosis del agente agresor. Estos PRR abundan en fagocitos y células presentadoras de antígeno.

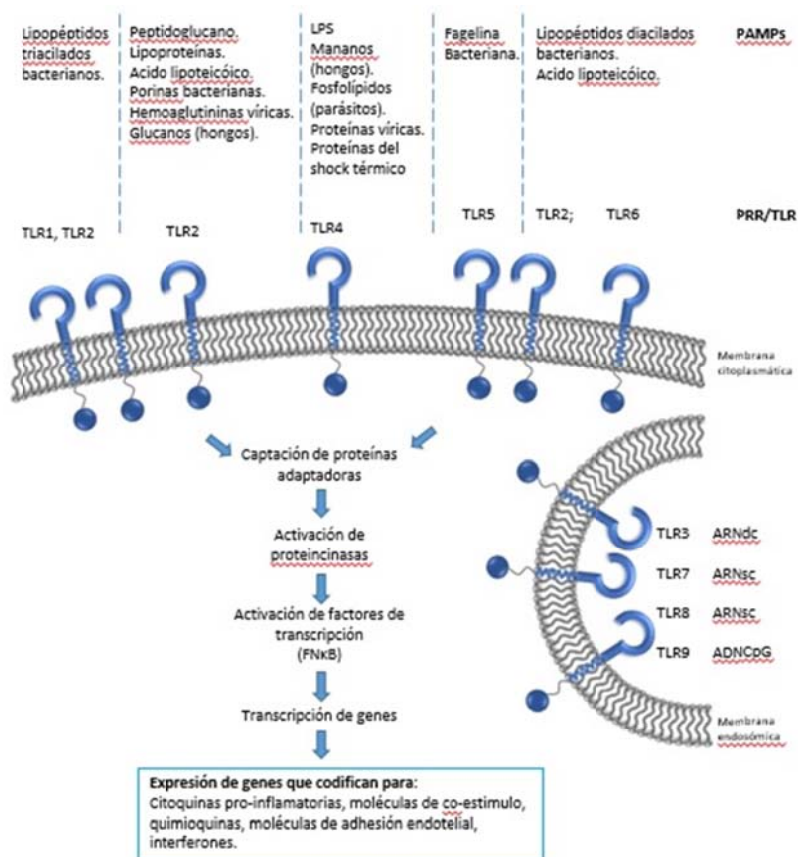


Figura 2. Esquema básico de la secuencia de reconocimiento, vía de señalización TLR y respuesta celular. Se enumeran los ligandos reconocidos por distintos PRR celulares ubicados en las membranas celular y endosómicas de las células procesadoras y presentadoras de antígeno. Se ejemplifica los pasos básicos de la cascada de activación de la vía de señalización TLR, con las moléculas transcritas por la activación de TLR 3 y TLR4. Las moléculas de co-estimulo son necesarias para completar la activación de LT vírgenes. Las moléculas de adhesión endotelial son imprescindibles para que las células efectoras puedan extravasarse al sitio de infección.

Los PRRs también se pueden clasificar según su ubicación en celulares y extracelulares; los PRR celulares a su vez se pueden dividir en: a) de membrana, b) citoplasmáticos y c) endosómicos. Los PRR extracelulares son aquellos solubles como algunas proteínas de fase aguda (Proteína fijadora de manosa –MBL, Proteína C reactiva-PCR, Proteínas surfactantes pulmonares A y D-SP-A y SP-D y Ficolinas H y L) producidas en el hígado y liberadas al torrente sanguíneo y actúan en el suero o cuando se extravasan al foco infeccioso. Una vez que reconocen su PAMPs específico, a su vez son reconocidas por PRR de superficie o por mecanismos de defensa como el sistema del complemento. En cambio los PRR celulares están anclados en la membrana externa (PRR de membrana) o anclados en la membrana de los endosomas o fagosomas (PRR endosómicos) o ubicados en el citoplasma (PRR citoplasmáticos). Según el lugar que ocupen será el tipo de PAMPs que reconozcan. Los PRR de membrana reconocen PAMPs externos de los patógenos, por ej. LPS, flagelos, ácido lipoteicoico y proteínas externas del cubierta viral, en cambio los PRR endosómicos reconocen estructuras microbianas que quedan libres al ser fagocitados los microorganismos, por ej. ARN doble cadena, ADN microbiano. Un ejemplo de PRR citoplasmáticos son los Receptores RIG-1

(*retinoic acid inducible gen 1*), herramientas centrales de las que se valen la mayoría de las células para responder a la infección viral mediante el reconocimiento del ARNdc viral.

Las vías intracelulares de señalización tienen la función de traducir señales o estímulos externos en una acción celular, por ejemplo la activación de una serie de genes relacionados con los sistemas de defensa del hospedador. Estas vías de señalización dependen de grandes complejos multiproteicos que comienzan con el estímulo de receptores de superficie celular (por ej. PRR) por parte de un ligando específico (por ej. PAMPs) y emiten una señal intracelular iniciando una cascada de actividad enzimática que terminan activando factores de transcripción (por ej. factor nuclear kappa B- NFkB) que desreprimen los genes que codifican citoquinas, moléculas de adhesión, de co-estimulo, proteínas internas involucradas en diferentes funciones celulares (diapédesis, endocitosis, procesamiento y presentación, migración, etc.), síntesis de péptidos antimicrobianos, generando una respuesta celular específica (Figura 2).

3. Efectores del sistema inmune innato

Las herramientas y procesos con los que cuentan el sistema inmune innato se ponen en acción una vez que reconocido el patógeno por los mecanismos mencionados.

Fagocitosis

Existen células denominadas fagocitos especializadas en reconocer microorganismos y endocitarlos para su eliminación. Los fagocitos profesionales incluyen a los neutrófilos, monocitos, macrófagos y en menor medida células dendríticas y mastocitos.

La célula representante de los fagocitos es el PMN, célula de vida media corta, con núcleo lobulado característico. A diferencia de los macrófagos y células dendríticas, no es una célula constitutiva del tejido sino que circula por la sangre patrullando el organismo y solo se encuentra presente en los tejidos por acción de sustancias quimiotácticas que lo dirigen al foco infeccioso. Cuando se instaura un foco infeccioso los fagocitos son una de las herramientas fundamentales para la eliminación de los microorganismos que sobrepasaron las barreras físicas/químicas de la inmunidad innata. La fagocitosis presenta 5 etapas secuenciales y lógicas:

- 1) Quimiotaxis: proceso por el cual los fagocitos atraídos por sustancias químico atrayentes llegan al foco infeccioso. Estas sustancias pueden ser metabolitos producto de la multiplicación microbiana o de los propios fagocitos que al activarse liberan quimioquinas específicas que atraen más fagocitos al lugar.
- 2) Adherencia: representa el momento del reconocimiento del patógeno. Este reconocimiento puede ser directo cuando el fagocito reconoce estructuras sobre el microorganismo (por ej. lectina tipo C como el receptor de manosa del macrófago que reconoce hidratos de carbono que no están presentes en el hospedador) o

indirecto, proceso llamado opsonización, en el cual los fagocitos reconocen PRR solubles unidos a patógenos (por ej. proteínas de fase aguda como surfactante pulmonar A y D, proteína fijadora de manosa PCR), fracciones del sistema del complemento (C3b y C4b), todas opsoninas de la inmunidad innata o también anticuerpos unidos a los patógenos, la única opsonina de la inmunidad adaptativa.

- 3) Endocitosis: internalización del patógeno al interior de la célula con la conformación del endosoma.
- 4) Digestión: proceso que se inicia cuando el endosoma se fusiona con el lisosoma y se conforma el fagolisosoma, compartimento celular donde se dan mecanismos microbicidas dependientes del oxígeno (sustancias letales para los microbios como peróxido de hidrógeno, anión hipoclorito) e independientes del oxígeno (enzimas degradativas y péptidos con actividad microbiostática o biocida).
- 5) Excreción: los productos de la digestión son liberados hacia fuera de la célula.

Cuando la fagocitosis la realiza un macrófago o célula dendrítica se dan otros procesos más complejos. Concomitantemente a la etapa de adherencia ocurre el reconocimiento por parte de PRR de señal, se activan las vías de señalización y se liberan citoquinas responsables de potenciar el proceso inflamatorio (Figura 3). Si el estímulo antigénico persiste, las citoquinas liberadas por el macrófago tienen efectos en órganos distantes que se complementan con la acción local promoviendo la inflamación, la eliminación del agente y la migración de las células dendríticas a los órganos linfáticos como paso inicial de la activación de la respuesta adaptativa.

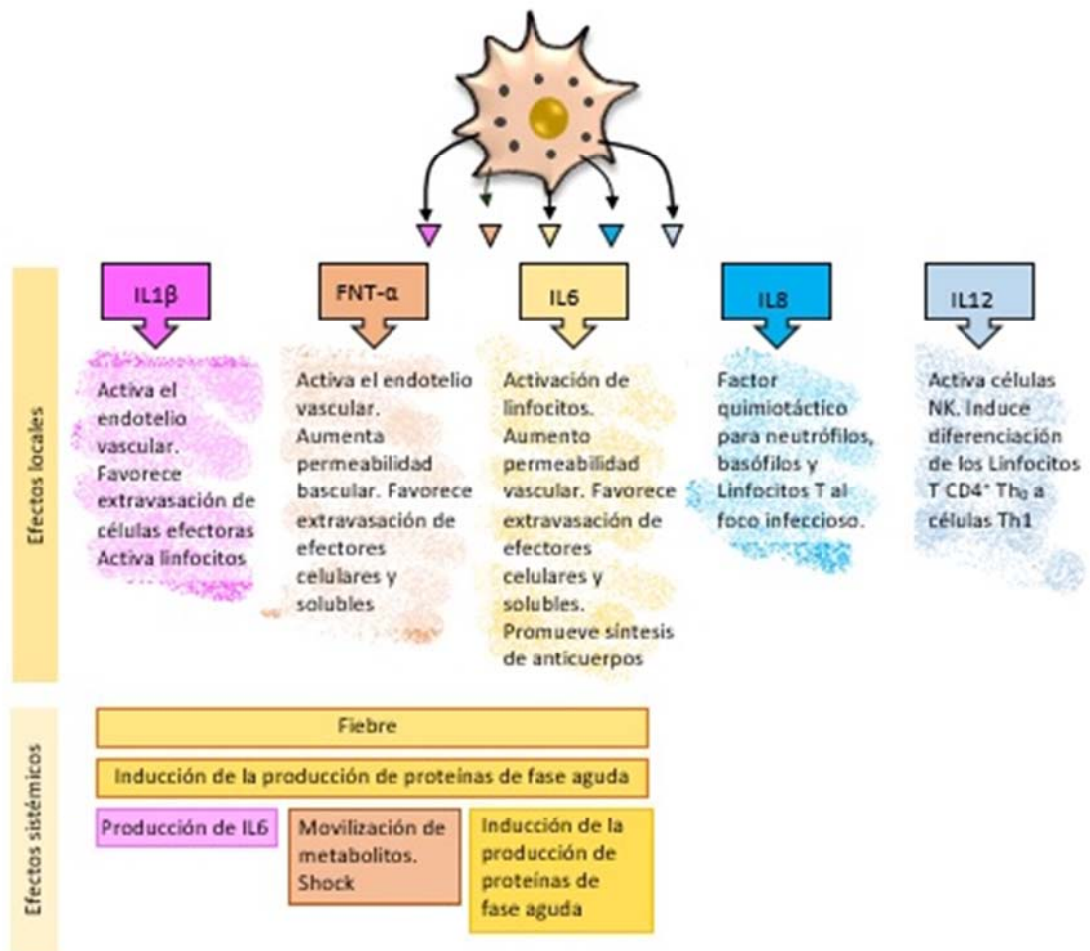


Figura 3: Citoquinas liberadas por el macrófago activado con efectos locales que favorecen el proceso inflamatorio, migración de los neutrófilos a través del endotelio vascular activado y acción de quimioquinas que dirigen a los neutrófilos hacia el foco infeccioso. Acción a distancia de las citoquinas proinflamatorias.

Proteínas de Fase aguda (PFA)

Las proteínas de fase aguda son un grupo de proteínas plasmáticas que cambian su concentración sanguínea (pueden aumentar hasta 10.000 veces) durante un proceso agudo de inflamación, ya sea infeccioso o no. Están involucradas en la restauración de la homeostasis, limitan el crecimiento bacteriano y contribuyen con la eliminación de agentes infecciosos, sobre todo bacterias. Las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-1 y TNF α , producidas por el macrófago activado, estimulan al hepatocito para su producción. La Tabla 2 enumera las PFA más relevantes, su función y comportamiento durante el proceso inflamatorio agudo.

Tabla 2. Proteínas de fase aguda más relevantes: función y comportamiento durante el proceso inflamatorio agudo

Clasificación	Proteína de fase aguda	Incremento	Función
PRR	Proteína C Reactiva (PCR)	++++	Reconoce PAMP en bacterias, hongos y cuerpos apoptóticos. Por ej. Fosforilcolina.
	Amiloide P Sérico	++++	Reconoce PAMP en bacterias, hongos y cuerpos apoptóticos. Por ej. fosfatidilietanolamina.
	Lectina fijadora de manosa	+++	Reconoce PAMP, manosa y fructosa.
	Surfactante A y D	+++	Reconoce PAMP
Fracciones del complemento	C3	++	Fracción donde convergen las 3 vías de activación. Precursor de opsonina
	C5	++	Precursor de anafilotoxina
	Componente B	++	Precursor de convertasa C3 de la Vía alterna
Factores de la cascada de la coagulación	Fibrinógeno	++	Frente al daño endotelial la formación de coágulos circunscribe la lesión y evita la diseminación del agente
	Factor VII	++	
	Protrombina	++	
Homeostasis	α -1 Antitripsina	+	Potente inhibidor de proteasas séricas
	α - 2 macroglobulina	+	
Otros	Ferritina	+	Secuestro de hierro. Limita crecimiento bacteriano

Sistema del complemento

El sistema del complemento es uno de los componentes principales de la respuesta inmune innata, formado por más de 30 proteínas distribuidas en la circulación y los tejidos, secretadas en forma continua y concentración basal por diferentes células, que durante la inflamación aguda y estimulada tanto por citoquinas como hormonas, aumentan su concentración. A pesar de la falta de especificidad del complemento, está diseñado para reconocer indirectamente

aunque en forma selectiva, patógenos, cuerpos apoptóticos y células dañadas marcadas por PRR solubles (lectinas fijadoras de manosa PCR), anticuerpos o al depositarse en membranas celulares que no presentan moléculas inhibidores (Figura 4).

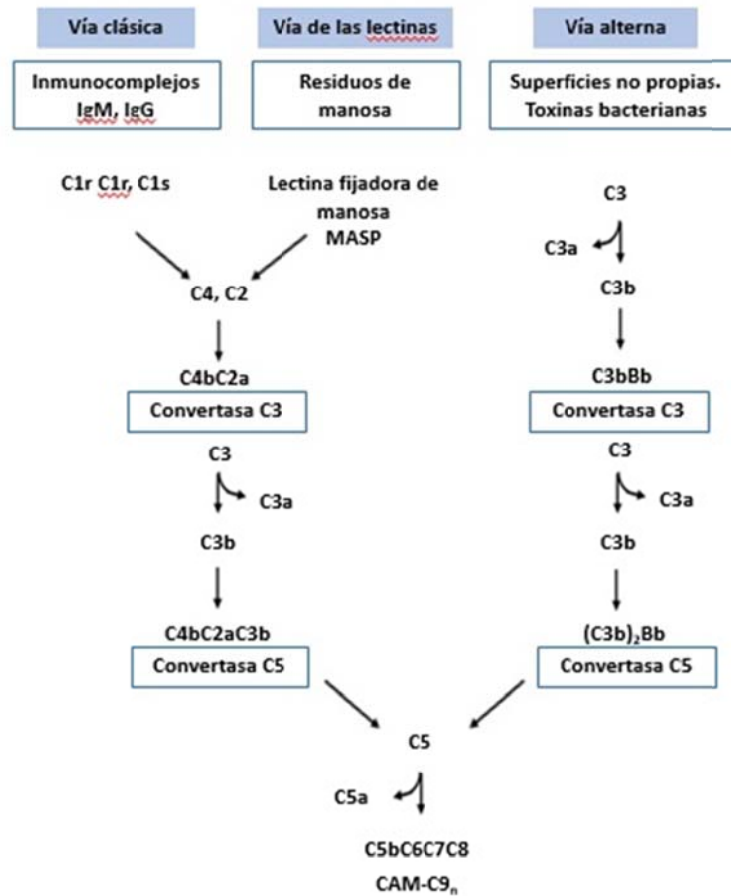


Figura 4: Cascada de la activación del sistema del complemento. Secuencia de activación de las tres vías que conducen a la formación de las convertasas C3 y C5. En la vía clásica C1r y C1s son las serin-proteasas asociadas a C1q. En la vía alterna, el Factor B es una proteína plasmática que es escindida por el Factor D en Bb, al acoplarse con C3b conforman la convertasa C3 de la vía alterna. Las tres vías convergen en el clivaje de C5 para dar lugar a la etapa de acoplamiento de las fracciones del complemento y finalizar con la conformación del complejo de ataque de membrana.

La activación del complemento ocurre en forma de cascada y genera 3 tipos de efectores: a) anafilotoxinas (C3a y C5a): potentes moléculas proinflamatorias que estimulan a los mastocitos y eosinófilos para su degranulación, estimulan dilatación de los pequeños vasos sanguíneos y atraen leucocitos; b) opsoninas (C3b, iC3b, C3d y C4b) que se unen covalentemente a las superficies de patógenos y células alteradas facilitando su remoción y c) el complejo de ataque de membrana (CAM), estructura terminal de la activación del complemento con la consiguiente lisis osmótica del patógeno o célula dañada. Las deficiencias adquiridas del complemento indican que su función está principalmente relacionada con la defensa contra bacterias y la remoción de inmunocomplejos.

El sistema de complemento es una sucesión de eventos que se pueden dividir en 3 etapas: activación, cascada enzimática y acoplamiento. Existen 3 vías de activación del sistema del complemento y según su aparición en la evolución la más antigua es la vía alternativa, luego la vía de las lectinas y por último en aparecer, la vía clásica.

La vía clásica se activa cuando la primera fracción del complemento de ésta, C1q reconoce inmunocomplejos. Específicamente, C1q reconoce una secuencia conservada del fragmento cristalizante (Fc) de la IgM o IgG, unidas a un patógeno o célula propia alterada. También reconoce inmunocomplejos formados por PCR y cuerpos apoptóticos. Este reconocimiento modifica la estructura de C1q activando 2 serin-proteasas asociadas que comienzan a clivar las fracciones del complemento. Así es como en los sucesivos clivajes se van conformando las convertasas C3 y C5. La convertasa de C3 cliva a C3 en C3a y C3b, produciendo cientos de fracciones, C3a es liberada al medio y C3b se une covalentemente a la superficie. C3b tiene 2 propósitos: uno es unirse a la misma convertasa de C3 y transformarse en convertasa de C5 y el otro, aquellos C3b que no están conformando la enzima actúan como opsoninas. La convertasa de C5 cliva a C5 en C5a y C5b y a partir de este último comienza la etapa de acoplamiento y conformación final del CAM por polimerización de varias fracciones C9 dando lugar a cientos de poros en la membrana celular causando la muerte por lisis osmótica.

La vía de las lectinas es casi idéntica a la clásica, salvo que en la activación intervienen otros actores. Los inmunocomplejos que activan esta vía están conformados por ficolinas o lectinas fijadoras de manosa (MBL), PFA que aumenta más de 1000 veces en la fase aguda de la inflamación. Estos PRR solubles reconocen hidratos de carbono propios de los patógenos.

La primera fracción del complemento involucrada en el reconocimiento del inmunocomplejo es la serin-proteasa asociada a la lectina fijadora de manosa (MASP-1 y MASP-2 por su sigla en inglés *Mannose-associated serine protease*) que, como las serin-proteasas asociadas a C1q, comienzan a clivar las primeras fracciones del complemento y comparten con la vía clásica las mismas enzimas y fracciones del complemento de las dos últimas etapas, enzimática y de acoplamiento.

La vía alternativa es la más antigua en términos evolutivos y su activación responde a la hidrólisis espontánea y continua de C3 en C3a y C3b. Esta característica le permite al sistema del complemento ser una herramienta de alerta y activación rápida y robusta frente a patógenos o células propias alteradas. Difiere de las otras vías en la constitución molecular de las convertasas, igualmente su función es la misma permitiendo las dos etapas y la formación final del CAM.

Las tres vías pueden activarse en simultáneo ya que la alterna es constitutiva y la clásica y la vía de las lectinas se activan por inmunocomplejos formados por anticuerpos naturales y de origen adaptativo, así como por PFA que actúan como PRR solubles y aumentan su concentración sérica entre 3-5 o 1000 veces en un proceso inflamatorio agudo. El C3b y C4b son productos del clivaje de C3 y C4, actúan como opsoninas unidas covalentemente a la superficie de patógenos y células, facilitando el transporte y la eliminación de inmunocomplejos. El transporte hacia el sistema reticuloendotelial se ve facilitado por los glóbulos rojos que

presentan receptores (CR1) para C3b y C4b que están tapizando células alteradas, cuerpos apoptóticos o patógenos. Una vez en el bazo o hígado los macrófagos especializados reconocen a los inmunocomplejos y los fagocitan para su eliminación. La actividad del sistema del complemento está regulada por proteínas solubles y de superficie celular. El mecanismo de acción y ubicación se detallan en la tabla 3.

Tabla 3: Mecanismos de acción de las proteínas reguladoras de la actividad del sistema del complemento

Regulador	Mecanismo de acción	Ubicación
Inhibidor del C1	Se une a las serinproteasas de C1q	Plasma
Proteína de unión al C4	Se une a C4b bloqueando la convertasa de C3	Plasma
Factor H	Se une a C3b bloqueando la convertasa de C3	Plasma
Factor I	Inactiva C4b y C3b	Plasma
Proteína S	Se une al complejo de acoplamiento C5bC6C7 bloqueando la formación de MAC	Plasma
Factor acelerador de la degradación (DAF)	Se une a C4b/C3b depositados en la superficie de células propias evitando la formación de convertasa C3	Membrana celular
Proteína cofactor de membrana (MCP)	Se une a C4b/C3b depositados en la superficie de células propias haciéndolas susceptibles a la acción de Factor I	Membrana celular
CR1	Se une a C4b/C3b depositados en la superficie de células propias Inhibe la formación de convertasa de C3	Membrana celular

Sistema del Interferón (INF)

Son una familia de citoquinas relacionadas estructuralmente que median la respuesta inmune innata temprana e interfieren en las infecciones por virus, de allí su nombre. Las células dendríticas o macrófagos son capaces de reconocer ácidos nucleicos virales a partir de PRR intracelulares (Figura 2). El ARN doble cadena, es una estructura que no se encuentra presente en los vertebrados superiores y representa un PAMP muy potente, reconocido por PRR endosómicos y citoplásmicos (TLR3 y RIG-1 respectivamente) que desencadena la síntesis de INFs. Existen dos tipos de interferones, INF tipo I y II.

- **INF tipo I.** Existen varios tipos de INF tipo I que según la especie tiene varios subtipos, INF- α , INF- β , INF- ϵ , INF- κ y INF- ω . Las células dendríticas plasmacitoides y los macrófagos son los principales productores de INF tipo I. Todos son estructuralmente similares y se unen a receptores propios o de células vecinas e inducen la activación de la vía de señalización Jak-STAT, que finaliza con la síntesis de enzimas como 2'-5' oligo-sintetasa o ARNasa que polimerizan nucleótidos incorrectamente o desintegran ARN, respectivamente. Así, se induce un estado refractario en la propia célula y en las vecinas que tiene como objetivo cortar la diseminación viral y contener el foco infeccioso. Por otro lado, también incrementan la síntesis y expresión de moléculas del CMH tipo I favoreciendo el reconocimiento y eliminación por apoptosis de estas células por la acción de los LT CD8⁺ citotóxicos. En los órganos linfáticos secundarios, los INF tipo I sintetizados por las células dendríticas plasmacitoides tienen 2 funciones principales, la de estimular el aumento de la expresión de receptores para IL-12 por parte de los Th₀ para que se diferencien a Th1 y potencian el secuestro de linfocitos en la zona T para favorecer la activación de los mismos.
- **INF tipo II.** El INF tipo 2 o INF- γ es sintetizado principalmente por las células NK, los LT CD4⁺ Th1 y por los LT CD8⁺ citotóxicos. Es la principal citoquina activadora de macrófagos y es primordial para la maduración de las células dendríticas y la polarización de la respuesta inmune hacia un perfil Th1 con la consiguiente instauración de la respuesta inmune contra microorganismos de vida intracelular. Sobre los LB promueve el cambio de isotipo de IgM a IgG.

Células de la inmunidad innata

Las células efectoras más abundantes del sistema inmune innato se originan en la médula ósea, salen a la circulación sanguínea y migran a los tejidos. Los fagocitos, macrófagos y PMN, conjuntamente con las células dendríticas pertenecen a la estirpe mielocítica y los linfocitos de la inmunidad innata, LT $\gamma\delta$, LB1, células naturalmente asesinas NK pertenecientes a la estirpe linfoidea representan las células efectoras del sistema inmune innato.

Los fagocitos tienen como función principal reconocer, endocitar y eliminar principalmente patógenos aunque también células muertas por apoptosis.

Neutrófilos

Son los leucocitos más abundantes en sangre y representan la primera línea de defensa en las primeras etapas de la inflamación. Los PMN toman su nombre de sus características morfológicas y tintoriales, su núcleo está lobulado y presentan un tipo de gránulo que no se tiñe con colorantes básicos ni ácidos. Estos gránulos se denominan específicos o primarios.

También presenta gránulos azurófilos o secundarios. El contenido de los gránulos se detalla en la tabla 3.

Tabla 3. Mecanismos microbicidas independientes del oxígeno

Ubicación	Proteína	Función
Gránulos Primarios	Defensinas	Desestabiliza la membrana bacteriana
	BPI (proteína inductora de la permeabilidad bacteriana)	Unión al LPS. Desestabiliza la membrana bacteriana
	Lisozima	Cliva peptidoglicano
	Hidrolasas	Clivaje de macromoléculas bacterianas
Gránulos secundarios	Catelicidinas	Múltiples efectos antimicrobianos
	Lactoferrina	Cliva peptidoglicano
	Lisozima	Cliva peptidoglicano
Ubicación inespecífica	Fosfolipasa A ₂	Destrucción de membrana bacteriana

Para eliminar a los microorganismos invasores los neutrófilos cuentan con 3 estrategias: 1) la fagocitosis y subsiguiente eliminación del patógeno internalizado, exponiéndolo a un estallido oxidativo y a compuestos antimicrobianos que son descargados en las vacuolas fagocíticas desde los gránulos citoplasmáticos; 2) la degranulación, que implica la liberación de sustancias antimicrobianas contenidas en los gránulos en el sitio de infección y 3) la recientemente descrita liberación de estructuras en red de ADN y contenido de los gránulos al espacio extracelular, conocidas como trampas extracelulares de neutrófilos (NETs, por su sigla en inglés *Neutrophil extracellular traps*). Estas trampas representan una estrategia de defensa para evitar la diseminación microbiana, concentrando la acción de los microbicidas y quizá promoviendo su sinergismo. El fenómeno de las NETs parece ser un evento previo a la muerte programada del neutrófilo, que se da pocas horas después de su llegada al foco infeccioso. En circulación, al cabo de unas 6 horas el neutrófilo que no fue reclutado a un foco infeccioso entra en apoptosis y es eliminado por los macrófagos del bazo o hígado.

Macrófagos

Los macrófagos se originan en la médula ósea, circulan por la sangre como monocitos no totalmente diferenciados y maduran a macrófagos en diferentes tejidos para quedar activos. A pesar de clasificarlos como fagocitos, presentan tres características distintivas con el neutrófilo: son células de vida media larga y se establecen en los tejidos como células residentes por semanas o meses. En las distintas locaciones donde actúan adquieren fenotipos especializados resultado del estímulo de factores presentes en cada microambiente. Según en qué órgano o tejido actúen toman nombres específicos como células de Kupffer en el hígado, macrófagos alveolares en pulmón o microglíocitos en el sistema nervioso central.

Actúan como células presentadoras y procesadoras de antígeno (CPA), grupo que también integran las células dendríticas y los LB. La diferencia entre las CPA está dada por que la única célula con capacidad de activar LT vírgenes e iniciar la respuesta inmune adaptativa es la célula dendrítica. Entonces ¿los LB y los macrófagos a quienes presentan los antígenos? Tanto los macrófagos como los LB, cada uno en su lugar específico, solo pueden estimular LT ya activados previamente por una célula dendrítica. Su función es potenciar la activación de estos linfocitos efectoras en el lugar de acción de los mismos.

Produce diversas citoquinas y quimioquinas según sea lo que reconozca a través de sus receptores: PAMPs, microorganismos opsonizados, cuerpos apoptóticos, citoquinas o quimioquinas. Esta capacidad de decodificar lo que está invadiendo o alterando al organismo y su extraordinaria capacidad de síntesis de citoquinas lo coloca como protagonista y modulador de la respuesta inmune innata y adaptativa (Figura 5).

En este sentido y según lo que reconozcan y las citoquinas actuantes, los macrófagos se diferencian en 2 perfiles de células. Aquellos estimulados por ciertos PRRs (TLR4, TLR9) y que sintetizan citoquinas claramente proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, IL-23, FNT- α) se los denomina M1 y responden a un perfil proinflamatorio. En cambio aquellos estimulados por IL-4, IL-13 y IL-10, glucocorticoides, sumado al reconocimiento de cuerpos apoptóticos y algunos mediadores liberados durante infecciones parasitarias, generan un perfil antiinflamatorio denominado macrófago M2. Estos últimos sintetizan citoquinas como IL-10 y TGF- β más especializados en la supresión de la respuesta inflamatoria y en la reparación tisular.

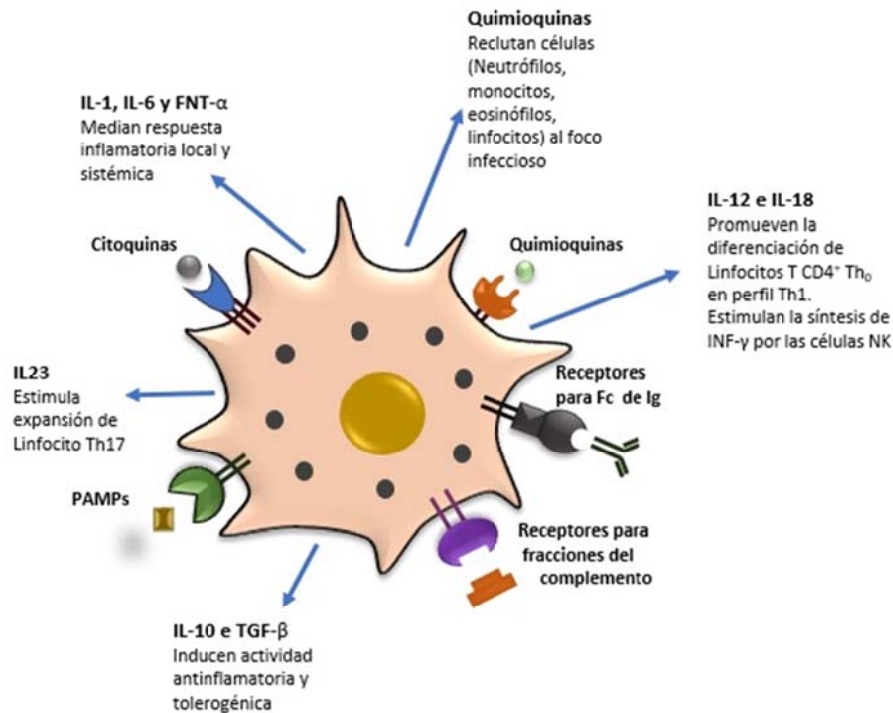


Figura 5. Citoquinas más relevantes producidas por los macrófago. Los macrófagos presentan receptores de superficie capaces de reconocer diferentes ligandos: PAMPs, fragmentos del complemento, quimioquinas y citoquinas. El estímulo de estos receptores conduce a la síntesis de numerosas moléculas, entre ellas citoquinas y quimioquinas que pueden agruparse en grupos de acuerdo con criterios funcionales.

Esta plasticidad funcional de los macrófagos permite que los cambios en su microentorno (básicamente que matriz de citoquinas y quimioquinas y estímulos y contactos celulares se estén sucediendo en ese lugar) conduzcan a direccionar su perfil funcional.

Fagocitosis y mecanismos de destrucción de microorganismos

Como ya se explicó, luego de la etapa de quimiotaxis y adherencia la fagocitosis continua con la endocitosis, momento en el que la célula fagocítica incorpora en un endosoma o fagosoma al microorganismo reconocido. Este compartimento se denomina endosoma temprano y madura al acidificarse activamente por una bomba de protones ATP dependiente y enzimas hidrolíticas proceso que ocurre en el transporte hacia el interior del citoplasma. Una vez en el citoplasma se transforma en endosoma tardío, el cual se fusiona con el fagosoma conformándose un tercer compartimento, el fagolisosoma. Los fagocitos cuentan con variados mecanismos citotóxicos para eliminar al patógeno fagocitado:

- Mecanismos microbicidas dependientes del oxígeno

Se basa en la formación de especies oxidantes derivadas del oxígeno también llamados intermediarios reactivos del oxígeno (IRO). El proceso denomina estallido respiratorio y ocurre

en el interior del fagosoma. Este mecanismo depende de un complejo enzimático NADPH oxidasa, que cataliza la reducción del oxígeno molecular en anión superóxido, que por sí solo no es muy tóxico. El ensamble de las proteínas que conforman este complejo enzimático es estimulado por el INF- γ . Otra enzima interviniente es la dismutasa, que actúa sobre el anión superóxido produciendo peróxido de hidrógeno, que es atacado por una tercera enzima, la mieloperoxidasa para formar otros IRO de carácter tóxico para las bacterias. Los IRO incluyen agentes oxidantes como: peróxido de hidrógeno (agua oxigenada), anión hipoclorito, radical hidroxilo, oxígeno singlete y cloraminas.

- Intermediarios reactivos del nitrógeno

Además de las IRO, los macrófagos producen intermediarios reactivos del nitrógeno, en especial óxido nítrico (ON). La enzima responsable se denomina óxido nítrico sintetasa inducible (INOs por su sigla en inglés *Nitric oxide synthase*), se activa solo después del reconocimiento de ciertos PAMPs y de la acción directa de INF- γ y FNT- α . El ON resultante es un gas de libre difusión que al penetrar en el fagolisosoma puede combinarse con el producto del estallido respiratorio y producir radicales de peroxidonitrito, compuestos muy reactivos capaces de destruir los microorganismos endocitados o aquellos de vida intracelular que encuentran en el macrófago su nicho de permanencia y evasión.

Cuando la actividad de los fagocitos es intensa los IRO, el ON y las enzimas lisosómicas son liberados al espacio extracelular pudiendo dañar los tejidos normales. Estos productos celulares no son capaces de distinguir entre lo propio y lo no propio.

- Mecanismos microbicidas independientes del oxígeno

Como se mencionó, en el interior de los gránulos de los fagocitos se acumulan agentes antimicrobianos como enzimas proteolíticas y péptidos antimicrobianos (Tabla 3). Estas moléculas pueden actuar en sinergia y mejorar su eficiencia de daño.

Mastocitos

Los mastocitos son células de vida media larga, evolutivamente conservadas en su función y a través de las distintas especies; se describieron hace más de 100 años y no se encuentran vertebrados superiores sin ellas. Se originan en la médula ósea, están presentes en sangre, pero se diferencian totalmente cuando penetran en el tejido encontrándose dispersas aunque abundan en la interfase con el medio ambiente, en cercanías de los pequeños vasos de piel y mucosas, desempeñando el rol de célula de reconocimiento de patógenos o signos de infección. Esta ubicación estratégica contribuye con su función como emisora de fuertes señales para las células circundantes así como distantes localizadas en nódulos linfáticos.

El citoplasma presenta múltiples gránulos que contienen distintas moléculas preformadas y acumuladas listas para su función: aminas vasoactivas como histamina y serotoninas;

proteoglicanos como heparina y condroitin sulfato y proteasas. También sintetiza varias citoquinas que modulan la respuesta inmune innata como adaptativa.

Están siempre asociadas a procesos de hipersensibilidad pero en estos últimos años hay evidencias de su importante rol en la respuesta antimicrobiana. Son capaces de reconocer patógenos y fagocitarlos, en forma directa ya que presentan receptores PRR o de forma indirecta, mediante receptores para factores de la inflamación como ciertas fracciones del complemento (C5a C3a) y receptores para reconocer anticuerpos asociados a patógenos. Se activa frente a una combinación de estímulos, señales de PAMPs y productos proinflamatorios originados en el foco infeccioso. En contraposición con la respuesta secretoria retardada que sufren las células dendríticas y epiteliales, la activación ocasiona la degranulación de los efectores preformados, por lo tanto su acción es inmediata.

Los efectos inmunes que produce la degranulación de los mastocitos son: dilatación de los vasos vecinos favoreciendo la llegada de células sanguíneas a la zona afectada; quimiotaxis de neutrófilos, NK y eosinófilos al foco infeccioso así como de LT CD8⁺; actividad antimicrobiana por acción de péptidos antimicrobianos e intermediarios reactivos del oxígeno; modulación del tráfico y activación de las células dendríticas, su migración hacia los órganos linfáticos secundarios y la capacidad de polarizar la respuesta inmune hacia un perfil Th2 a través de la producción de distintas citoquinas. Se demostró el rol de los mastocitos en infecciones bacterianas, parasitarias y algunos indicios de su participación en la respuesta antiviral.

Linfocitos de la inmunidad innata

Los linfocitos de la inmunidad innata son una estirpe celular emparentada con los linfocitos de la inmunidad adaptativa. Difieren principalmente en su ubicación en el organismo, composición y especificidad de sus receptores de reconocimiento y funciones. Dentro de este grupo están los LT $\gamma\delta$ ya descritos como linfocitos intraepiteliales, los LB1, NK y NKT.

Células naturalmente asesinas o NK (*Natural Killer*)

Las células NK fueron descritas originalmente por su habilidad espontánea de matar células tumorales o células infectadas por virus. Esta característica se debe a su capacidad de reconocerlas específicamente aunque también a células infectadas con otros microorganismos de vida intracelular, células transformadas, en proceso de estrés o marcadas con anticuerpos. Comparadas con los linfocitos convencionales, son células grandes con abundantes gránulos en su interior. Se ubican principalmente en sangre y en órganos linfáticos secundarios, médula ósea, bazo, timo y tejido linfoide. Presente en órganos relevantes como hígado, pulmones, peritoneo y abundan en el útero gestante, pero no lo están en tejidos periféricos sanos. Presentan dos funciones principales: citotoxicidad y producción de citoquinas. La activación de las células NK está regulada por un equilibrio entre señales generadas por receptores de inhibición y activación. Esta dupla de receptores reconoce estructuras propias y no propias en

la superficie de la célula afectada. Los receptores de inhibición reconocen moléculas del CMH tipo I expresadas en forma constitutiva en células sanas. Cuando una célula NK se encuentra con una célula sana, el receptor de inhibición la reconoce como propia y envía una señal de inhibición al interior de la NK para evitar que se active. Cuando una célula está alterada por ejemplo por estar infectada con un virus, éstos, por su mecanismo de replicación y por su afán de evadir la respuesta inmune pueden inhibir en forma parcial o total la síntesis del CMH tipo I, o que se exprese alterado en su composición o estructura. El receptor de inhibición al detectar lo propio ausente, disminuido o alterado no genera una señal de inhibición y la célula NK se activa. La activación genera ciertos cambios conformacionales que favorecen la liberación del contenido de sus gránulos (que contiene granzima B y perforina) induciendo una serie eventos moleculares que desencadenan la apoptosis o muerte programada de la célula blanco. Este tipo de muerte provoca que la célula pierda su conformación natural, se fragmente y de origen en numerosos cuerpos apoptóticos. La apoptosis tiene como finalidad eliminar una célula cuidando que no se liberen proteínas internas, potencialmente dañinas para el organismo o microorganismos de vida intracelular contribuyendo a su diseminación.

Por otro lado, cuando los ligandos del receptor de activación se encuentran recién inducidos o aumentados en su concentración, tanto en células infectadas o en las que están cursando un proceso de transformación, su mayor densidad permite a los receptor de activación vencer las señales inhibitorias del receptor de inhibición lo que pone a la célula NK en condiciones de destruir a la célula blanco. Otro receptor de activación lo constituye el CD16, receptor para la porción Fc de la IgG. Al detectar la presencia de esta inmunoglobulina en la superficie de una célula alterada, la célula NK se activa y provoca la muerte programada en la célula blanco, mecanismo denominado citotoxicidad mediada por anticuerpos. Recientemente se determinó la presencia de TLR (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 y TLR9) en estas células (Figura 6).

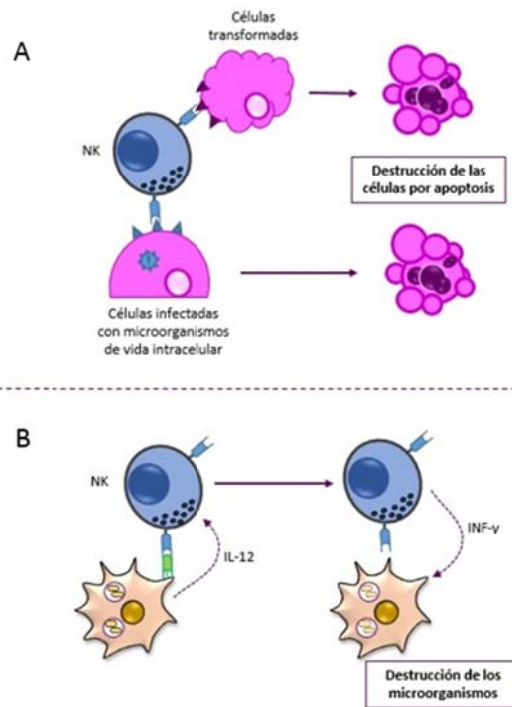


Figura 6. Funciones de la célula NK. A: Reconoce sus ligandos sobre las células afectadas e induce su destrucción por apoptosis. B: las células NK responden a la IL-12 producida por los macrófagos y secretan INF- γ , que activa los macrófagos para destruir microorganismos fagocitados.

La actividad de las células NK se ve modulada por citoquinas sintetizadas en el sitio de acción. Existe una retroalimentación interesante entre las células NK y los macrófagos. Como ya se explicó, una vez que el macrófago reconoce y fagocita algún agente extraño se activan las vías de señalización que finalizan con la síntesis de citoquinas, como la IL-12 e IL-15, también estimulada su síntesis los INFs tipo I liberados por células infectadas por virus; éstas inducen la síntesis de INF- γ y en conjunto promueven la activación de la NK. Los cuerpos apoptóticos, resultado de la muerte programada inducida por las NK sobre las células infectadas, son reconocidos por células dendríticas macrófagos y otros fagocitos al foco infeccioso. Una vez en el interior de los macrófagos, algunos patógenos de vida intracelular son difíciles de eliminar y sin embargo al recibir el estímulo del INF- γ de origen innato, finalmente son eliminados. Sin embargo y frente a microorganismos muy adaptados, esta asociación a veces no es suficiente para eliminarlos aunque permite controlarlos y otorga el tiempo suficiente para que se establezca la inmunidad celular adaptativa para erradicarlos, donde la expansión clonal de los linfocitos específicos asegura el éxito en la resolución del problema.

Células dendríticas

Las células dendríticas (CD) se originan en la médula ósea del tronco mieloide común. Se ubican en diferentes órganos, pero sobretodo son células centinelas presentes en piel y mucosa, así como en órganos linfáticos secundarios puerta de entrada de los patógenos. Cumplen un papel crítico y de nexo entre la inmunidad innata y adaptativa. Tienen 3 funciones:

Reconocimiento de PAMPs: sensor de patógenos o señales de daño; activar LT vírgenes
 Iniciando la respuesta inmune adaptativa y modular la respuesta inmune mediante síntesis de citoquinas y quimioquinas.

Las CD, según su momento de activación, presentan 2 fenotipos: inmaduras y maduras. Las CD inmaduras tienen propiedades fundamentales para cumplir con su función de centinela, se caracterizan por su alta capacidad de endocitosis y procesamiento antigénico y baja capacidad de presentación antigénica, también carecen de receptores de quimioquinas liberadas desde los órganos linfáticos secundarios. Estas células no solo presentan PRR sino también múltiples y variados receptores para citoquinas y quimioquinas. El estímulo más potente para una CD inmadura es el reconocimiento de los PAMPs. En conjunto con citoquinas y quimioquinas liberadas en el foco infeccioso inducen en ellas un cambio espectacular que se denomina “maduración de la célula dendrítica”. Este proceso de cambio fenotípico y funcional termina con una célula denominada “madura” capaz de presentar y activar a los LT vírgenes induciendo su expansión clonal y diferenciación, por lo tanto es la responsable de la activación de la respuesta adaptativa. En la figura 7 se contraponen las características de los distintos fenotipos de células dendríticas.

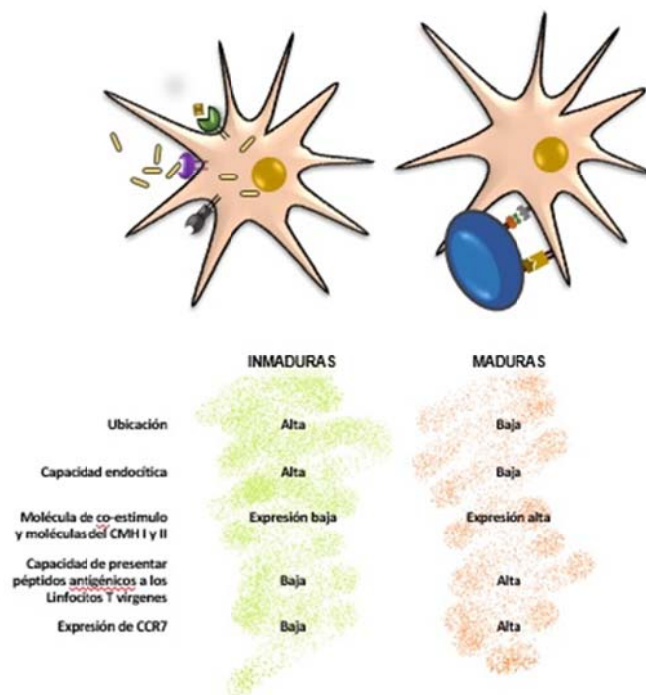


Figura 7. Características funcionales de las células dendríticas

Interacción entre células NK, macrófagos y células dendríticas

Las NK no solo son meras células citotóxicas efectoras, en contexto de una infección con microorganismos de vida intracelular o transformación celular maligna son capaces de modular el curso global de la respuesta inmune innata y adaptativa. En este sentido, es particularmente relevante la producción de INF- γ . Solo dos células de la inmunidad innata son capaces de producirlo en la etapa temprana de la instauración de un foco infeccioso, casualmente son dos

linfocitos de la inmunidad innata, LT $\gamma\delta$ y las NK. Por mucho tiempo se le dio importancia solo a la capacidad del LT $CD4^+$ Th1 como gran productor de esta citoquina pero las NK hoy son reconocidas como la primera fuente de INF- γ en el transcurso del proceso infeccioso. Las células NK salen del torrente sanguíneo y acceden al tejido infectado atraídas por quimioquinas como IL-8 y en el tejido la célula recibe diferentes tipos de estímulos: reconoce PAMPs, es estimulada por las citoquinas proinflamatorias liberadas por el macrófago residente y por los INF tipo I secretados por las células blanco infectadas y principalmente detecta la ausencia, disminución o alteración de lo propio, así como lo “no propio” mediante los receptores de inhibición y activación respectivamente y ya comentados. Estas señales llevan a la activación de la NK y la producción de grandes cantidades de INF- γ que median dos funciones claves para el desarrollo de la respuesta inmune: activa a los macrófagos y promueve la maduración de las células dendríticas. La entidad “macrófago activado” refiere a un estado de hiperactivación del macrófago, en el cual varias herramientas de destrucción y procesamiento se ven potenciadas en favor de una actividad más eficiente: conjuntamente con el FNT- α , el INF- γ activa la INOs que media la producción de óxido nítrico, con su acción biocida *per se* y su combinación con diferentes IROs. Del mismo modo se ve potenciada la acción del proteasoma, que al estar estimulado con esta citoquina configura su estructura proteolítica para ser más eficiente al momento de producir péptidos antigénicos, tomando en este momento el nombre de proteasoma inmune. Finalmente el INF- γ induce el incremento de la síntesis y expresión del CMH tipo I y II favoreciendo su potencial de CPA. Sumado a todo lo resaltado, la mayor producción de citoquinas proinflamatorias por parte de un macrófago activado, lleva al aumento de la intensidad de activación de la propia NK mediada por IL-12, IL-15, IL-18, IL-22 y FNT- α .

En cuanto a la activación de la célula dendrítica, el estímulo del INF- γ en el foco infeccioso es clave para la polarización de una respuesta inmune adaptativa eficaz hacia un perfil Th1, necesario para combatir una infección mediada por microorganismos de vida intracelular a los que se elimina principalmente con una respuesta inmune celular asistida por una respuesta humoral. Como se mencionó, una célula dendrítica en reposo denominada inmadura, cambia su conformación fenotípica y funcional no solo al reconocer y endocitar a un patógeno, sino también por el estímulo del INF- γ pasando a denominarse célula dendrítica madura. No todas las células dendríticas cambian de perfil de forma exitosa y por lo tanto, no fueron capaces de expresar en mayor número CMH tipo I; en consecuencia y teniendo en cuenta que las NK son especialistas en sensor este tipo de estructuras sobre las células, ejercen un control de calidad y aquellas células dendríticas que no logren madurar adecuadamente son inducidas a apoptosis por acción de esta célula. Como resultado de su activación y el cambio de receptores de quimioquinas, las células dendríticas maduras se dirigen al órgano linfático regional del sitio de infección. Allí interactúan nuevamente con las NK residentes activándolas por estímulo con citoquinas inflamatorias, en especial por las células dendríticas plasmacitoides, grandes productoras de INF tipo I. La producción de INF- γ por parte de las células NK es fundamental para la inducción de la síntesis de IL-12 en el microambiente del ganglio y su acción imprescindible para la diferenciación del LTh0 en Th1 y la activación de los LT $C8^+$ citotóxicos.

Procesamiento y presentación antigénica

Ya se comentó que las células dendríticas, conjuntamente con LB y macrófagos pertenecen al grupo de células procesadoras y presentadoras (CPA). Las etapas de una respuesta inmune involucran reconocimiento del patógeno, procesamiento y presentación del mismo para activar funciones efectoras en los LT. Las células dendríticas son las únicas capaces de presentar antígenos a los LT vírgenes y activarlos. Los macrófagos y LB sólo pueden interactuar con LT ya activados por una célula dendrítica madura.

Hay 2 vías principales de procesamiento: la vía endógena, presente en todas las células del organismo, cuyos productos activan específicamente a los LT CD8⁺ citotóxicos y la vía exógena, que tiene lugar sólo en las CPA responsable de la activación específica de los LT CD4⁺ colaboradores.

Para comprender los sucesos coordinados y lógicos de las etapas de procesamiento y presentación debemos conocer quiénes son los actores y sus moléculas.

Moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad o CMH. Se originan de un grupo de genes denominados Complejo Mayor de Histocompatibilidad que codifican moléculas que intervienen en procesos fisiológicos propios de las células inmunes y no inmunes. Su función inmune primordial es capturar péptidos antigénicos derivados de las moléculas presentes en los microorganismos. Estos péptidos son fragmentos del clivaje de proteínas microbianas que se generan en distintos compartimentos intracelulares como el fagolisosoma, capturados por las moléculas del CMH son presentados en la superficie celular para poder ser reconocidos por los LT. Se caracterizan por ser muy polimórficas. Existen 2 tipos principales de moléculas involucradas en el procesamiento y presentación de antígenos: CMH tipo I, son glucoproteínas de membrana que se expresan en la superficie de todas las células nucleadas, cuya función es presentar péptidos antigénicos a los LT citotóxicos CD8⁺ y CMH tipo II, presentes sólo en la superficie de las CPA (macrófagos, células dendríticas y LB) con el objetivo de presentar péptidos antigénicos a los LT CD4⁺ colaboradores o *helper* (Th).

CD o Cluster de diferenciación. Son proteínas que normalmente actúan como receptores que se encuentran en la superficie celular y tienen una función de reconocimiento ligando-específico. Su presencia o la combinación de varias de estas proteínas define o “marca” a una célula o grupo de células, es así que también los CD toman el nombre de marcador celular. En este sentido si una célula presenta un CD4 o un CD8, asociado a un TCR se puede clasificar como LT colaborador o citotóxico, respectivamente. A los CD4 y CD8 también se los puede denominar correceptores ya que conjuntamente con el TCR y CD3, este último marcador de población de LT, conforman el complejo TCR.

Chaperonas. Son un grupo numerosas de familias de proteínas no relacionadas, cuya función es estabilizar las proteínas desplegadas para su translocación a través de membranas o para su degradación y/o ayudarlas para su correcto plegamiento y ensamblaje. No forman parte de la proteína asistida. Son esenciales para la viabilidad celular.

En esta sección nos concentraremos en explicar los procesos de procesamiento y presentación que se suscitan en una célula dendrítica.

Como se comentó, todas las células del organismo presentan CMH tipo I, moléculas que son parte de la vía degradativa fisiológica de proteínas, presente en todas las células. El objetivo de esta vía, llamada vía de procesamiento endógeno, es degradar proteínas propias que hayan cumplido su función o alteradas por distintos factores por ej. mal plegamiento. En este caso una célula normal está constantemente expresando péptidos endógenos propios asociados al CMH tipo I. No obstante cuando una célula es infectada por un microorganismo de vida intracelular, como un virus, éste en particular se apodera de la maquinaria biosintética de su célula blanco para producir sus propias proteínas y ácidos nucleicos, replicar e infectar otras células. En esta situación, la vía endógena de procesamiento, comienza a degradar proteínas virales y los péptidos antigénicos resultantes son cargados en el CMH tipo I y presentados en la superficie celular.

La degradación proteica en el citoplasma se lleva a cabo por un complejo multienzimático denominado proteasoma. Reconoce proteínas citosólicas marcadas por una proteína llamada ubiquitina, que acceden al interior del proteasoma que las degrada a péptidos cortos (8 a 9 aminoácidos). Estos péptidos son translocados al interior del RER por la acción de chaperonas o transportadores asociados a la presentación antigénica, TAP1/TAP2. Una vez en el interior del RER otras chaperonas asisten al ensamblado de las moléculas de CMH tipo I y al cargado del péptido. Así conformado el complejo CMH tipo I-péptido antigénico, éste deja el RER y luego de atravesar por el aparato de Golgi, finalmente se expresa en la membrana celular. Es así como en una célula infectada los péptidos antigénicos son expresados en el contexto del CMH para poder ser reconocidas por los ILT CD8⁺ citotóxicos.

La vía de procesamiento exógena, posible solamente en las CPA, comienza con la endocitosis del patógeno o molécula extraña. Todos los microorganismos o estructuras que los contienen (ej. cuerpos apoptóticos) o macromoléculas, son reconocidos por receptores PRR de superficie y así son incorporados a la célula en endosomas los cuales acidifican activa y paulatinamente su contenido y se fusionan con los lisosomas, conformando los fagolisosomas donde se da la lisis de los microorganismos y la degradación proteolítica de sus constituyentes. Al igual que las moléculas del CMH tipo I, las moléculas clase II, se sintetizan y se ensamblan en el RER. Como se detalló, en la luz del RER están los péptidos antigénicos producto de la vía endógena. Para evitar la unión de estos péptidos con las moléculas del CMH tipo II al momento de su ensamblaje el sitio de unión con el péptido es obturado por una molécula o cadena invariante (Li) con dos funciones adicionales: colaborar con el correcto ensamblaje de la molécula y direccionar el tráfico hacia los fagolisosomas. Las vesículas con el CMH II se fusionan con el fagolisosoma, donde se produce el ensamblaje del péptido antigénico derivado

del patógeno con las moléculas del CMH II, para finalmente ser transportadas a la membrana celular y ser reconocidas por a los LT CD4⁺ colaboradores.

Las CD, como cualquier célula nucleada, pueden procesar por vía endógena; sin embargo no tienen la capacidad de ser infectadas por todos los virus, parásitos, bacterias u hongos de vida intracelular, lo cual sería muy desafortunado para estas células y el animal. ¿Cuál es, entonces, la estrategia con la que cuentan estas células para poder procesar por vía endógena microorganismos con especificidad por otras células y poder activar a los LT CD8⁺ citotóxicos? Las CD cuentan con un atajo, la vía de procesamiento cruzada, que se constituye como puente entre la vía exógena y la vía endógena. Durante la acidificación paulatina del endosoma (que contiene microorganismos, sus productos o partes de los mismos incorporados por endocitosis), algunas proteínas antigénicas escapan de este compartimiento hacia el citoplasma, donde son detectadas como extrañas y señaladas por la ubiquitina para su ingreso a la vía endógena. De esta manera, la CD es capaz de presentar en el contexto del CMH I a los linfocitos CD8⁺ citotóxicos, péptidos antigénicos derivados de microorganismos endocitados.

Los sistemas inmunes innato y adaptativo reconocen a los patógenos de forma diferente. En el sistema inmune innato las CPA son las encargadas de reconocer PAMPs, pero sólo las CD dejan el foco infeccioso y migran hacia los órganos linfáticos secundarios regionales siendo las únicas capacitadas para activar a los LT. Los LB ubicados en los órganos linfáticos secundarios reconocen antígenos sobre los microorganismos, en su constitución nativa; reconocen la estructura química y espacial no sólo de proteínas, sino también de hidratos de carbono, lípidos y ácidos nucleicos. En cambio los LT sólo reconocen antígenos proteicos.

Inmunidad Adaptativa

Los LT y LB constituyen los elementos celulares de la respuesta inmune adaptativa. Muchos factores diferencian la inmunidad innata de la adaptativa, siendo el más relevante la estrategia de reconocimiento de los microorganismos. Cuando mencionamos las células de la inmunidad innata encargadas de reconocer a los microorganismos resaltamos la importancia de reconocer estructuras conservadas, fundamentales para la supervivencia y comunes a un grupo de patógenos, los denominados PAMPs. Por el contrario, los LT y LB reconocen motivos particulares, detalles moleculares con mínimas diferencias presentes en los patógenos denominados epitopes antigénicos. Detectan su presencia mediante receptores que reconocen una secuencia de unidades estructurales que están componiendo ese antígeno, ejemplo una secuencia de 10 aminoácidos de una proteína, del mismo modo para epitopes antigénicos no proteicos (hidrato de carbono, lípidos, ácidos nucleicos, etc.). Por las diferencias entre patógenos y mucho más por las diferencias filogenéticas entre bacterias, virus, hongos y parásitos, es muy poco probable que esa secuencia específica pueda estar en otro

microorganismo, inclusive de la misma familia o género. De esta explicación podemos definir que un epítope representa una entidad sumamente singular y propia de un componente de un microorganismo determinado. De esta explicación surgen dos preguntas claves: ¿Con cuántos epítopes debe lidiar el animal? y ¿Cómo hace el sistema inmune adaptativo para reconocerlos en forma diferencial? De la primera pregunta podemos decir que existen miles y miles de epítopes diferentes, pero contestando la segunda pregunta comprendemos por qué los vertebrados superiores seguimos en pie: el sistema adaptativo cuenta con millones de clones de LT y LB con diferente especificidad, repertorio potencialmente capaz de reconocer secuencias diferentes y por otro lado no reconocer las propias. Como ya se detalló, durante la ontogenia linfocitaria el sistema inmune adaptativo adquiere un amplísimo repertorio de receptores. En la sección siguiente se detallan someramente las características fenotípicas de LT y LB para comprender sus funciones celulares. En la figura 8 se identifican las principales poblaciones de linfocitos, células y efectores solubles que caracterizan a la inmunidad adaptativa.

Inmunidad celular

Células B y células T. Receptores.

Los linfocitos se encuentran recirculando constantemente entre los diferentes órganos y tejidos linfoides asociados a piel y mucosas, en búsqueda de su epítope antigénico específico. La sangre los vehiculiza vírgenes o activados para llevarlos hacia sus sitios de activación o acción, respectivamente. Las poblaciones de linfocitos se pueden clasificar según distintos enfoques: según su origen, en LT que adquieren su receptor TCR en el timo y los LB que adquieren su receptor BCR en la médula ósea; según su estado de activación/fenotípico, en linfocitos vírgenes, aquellos que nunca contactaron con su epítope antigénico; linfocitos efectores, los que una vez activados están aptos para ejercer su función y linfocitos de memoria, aquellos que quedan como recuerdo del contacto, fenotípicamente mejor preparados para responder de forma más rápida y eficaz en un posterior contacto con el mismo antígeno.

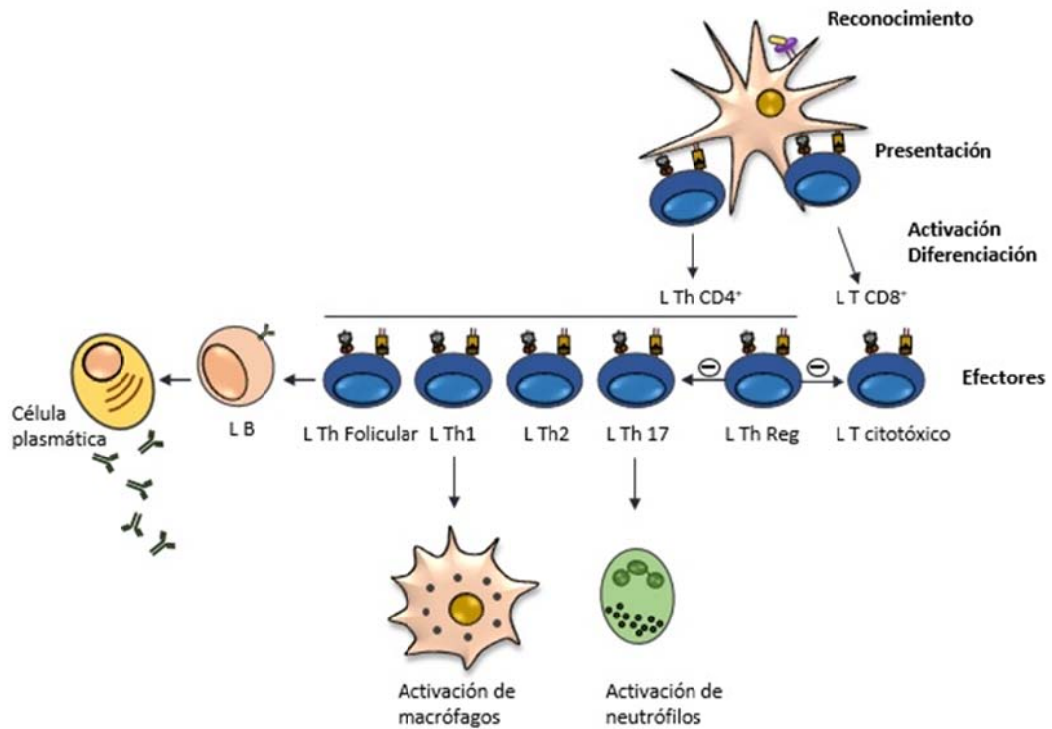


Figura 8. Etapas de la respuesta inmune. El reconocimiento del patógeno en la respuesta innata conlleva a su procesamiento y presentación del producto del procesamiento. El reconocimiento de los péptidos antigénicos induce la activación, proliferación y diferenciación de las células T. De este modo los LT se diferencian en efectores.

Receptor de los linfocitos B

Los LB reconocen epitopes mediante el BCR. El BCR es una inmunoglobulina de superficie. El complejo BCR está conformado por varias estructuras relacionadas con el reconocimiento de epitopes y la traducción de la señal hacia el interior de la célula (Figura 9). El receptor BCR al igual que las inmunoglobulinas solubles es capaz de reconocer antígenos en forma nativa, en su estado natural, es decir no necesita de procesamiento previo del antígeno. Un clon de LB en su superficie tiene miles de receptores BCR, todos y cada uno de ellos reconoce el mismo epitope con alta especificidad.

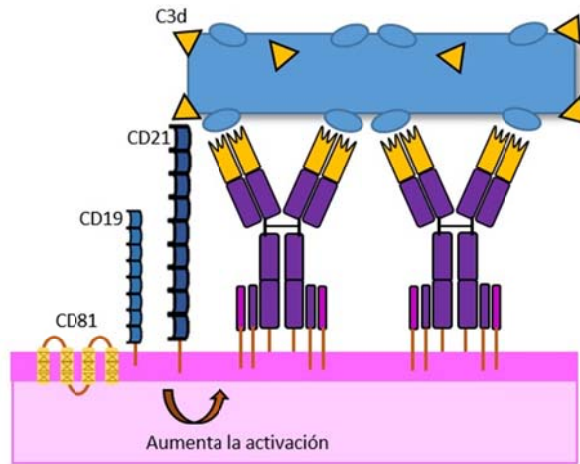


Figura 9. El complejo BCR está compuesto por el BCR o inmunoglobulina de superficie responsable de reconocer específicamente su epítopo específico, flanqueada por dos heterodímeros formados por dos cadenas de Ig α e Ig β con función de traducción de la señal al interior de la célula y la expresión de la inmunoglobulina en la superficie celular. Acompañando a esta estructura se encuentran otras moléculas que complementan el reconocimiento y potencian la activación del LB. CD21: reconoce productos de degradación del C3, por ej. C3b. CD19 y CD81: moléculas relacionadas con la amplificación de la señal.

Receptor de los LT

Los LT reconocen péptidos antigénicos mediante el TCR. El TCR está constituido por 2 cadenas distintas que constituyen un heterodímero anclado a la superficie celular; las cadenas pueden ser $\alpha\beta$ presentes en los LT convencionales o cadenas $\gamma\delta$ propias de los LT $\gamma\delta$ de la inmunidad innata. El TCR forma parte del complejo TCR, junto con moléculas CD3, encargadas de la traducción de la señal de activación hacia el interior de la célula y las moléculas co-receptoras CD4 o CD8 que definen subpoblaciones colaboradoras o citotóxicas respectivamente. La estructura del complejo TCR se esquematiza en la figura 10.

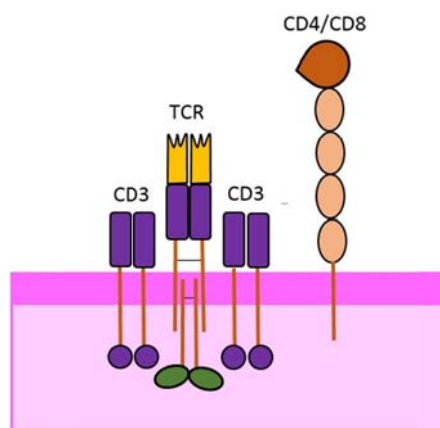


Figura 10. Estructura del complejo TCR.

Como se mencionó en la sección de ontogenia del sistema inmune, los LT colaboradores, mediante la molécula CD4, reconocen una secuencia conservada de la molécula de CMH tipo

II; en cambio los LT citotóxicos a través de su co-receptor CD8 reconocen al CMH tipo I. Los LT vírgenes sólo reconocen péptidos antigénicos resultantes del procesamiento antigénico por parte de una célula dendrítica. Una vez que los LT reconocen su péptido antigénico en el contexto del CMH, se activan, diferencian y proliferan, pero a diferencia de los LB, no liberan su receptor como molécula soluble. En la figura 11 se pueden observar las distintas subpoblaciones de LT.

Funciones de las poblaciones de LT

Al cabo de unos días a 1 semana después de la entrada de un microorganismo, aparece una gran cantidad de linfocitos efectores listos para enfrentar al patógeno. Existen diversas subpoblaciones de LT diferenciados en efectores con funciones distintas y contrapuestas (Figura 11). En términos generales los LT CD4⁺ colaboradores modulan la respuesta inmune innata y adaptativa mediante una coordinada y exquisita combinación de citoquinas. En cambio los LT CD8⁺ citotóxicos tienen como función eliminar por apoptosis células infectadas principalmente por microorganismos de vida intracelular. Ambas poblaciones dejan memoria del contacto. El modo de acción de los LT CD8⁺ es semejante a los mecanismos llevados a cabo por las células NK. La diferencia más marcada entre ellos es la forma de reconocer la célula alterada. Los LT CD8⁺ citotóxicos reconocen péptidos antigénicos en el contexto del CMH tipo I resultado del procesamiento por vía endógena del microorganismo.

Los LT CD4⁺ colaboradores son liberados del timo como linfocitos Th₀. Según el tipo de microorganismo actuante en el foco infeccioso, las células del sistema inmune innato producen ciertas citoquinas que modulan la diferenciación de los linfocitos Th₀ en los diferentes subtipos de LT colaborador. Los LT CD4⁺ proveen colaboración a los LB para promover todos los eventos que se dan lugar en el folículo de los órganos linfáticos secundario. Otra función de los LT CD4⁺ está relacionada con la habilidad de modular la actividad microbicida de fagocitos, especialmente de macrófagos.

Recapitulando, los microorganismos de vida extracelular son eliminados al ser opsonizados con fracciones del complemento, PFA y por anticuerpos y reconocidos por células fagocíticas. Si los microorganismos son reconocidos por CD la endocitosis es parte del procesamiento y presentación antigénica que activará a los LT vírgenes. Si los microorganismos son de vida intracelular, las células infectadas serán reconocidas y eliminadas por apoptosis por los LT CD8⁺ citotóxicos. Para el caso de microorganismos que inhiben el aparato vacuolar del macrófago, lo que se requiere para su eliminación es el estímulo humoral de los LT CD4⁺ Th 1.

Paradigma de Th1/Th2

Del estudio de estos fenómenos y la determinación de un perfil de citoquinas actuantes que difería en su combinación según el tipo de patógeno, se postuló el paradigma de Th1/Th2. Según el tipo de patógeno actuante los clones de linfocitos producen un patrón determinado de citoquinas. Cuando los clones involucrados en la respuesta producen IL-2, INF-γ y FNT-α se

denomina respuesta Th1. Cuando se produce IL-4, IL-5 e IL-13 la respuesta se clasifica como Th2. La diferencia entre el perfil de citoquinas, la expresión de receptores y función biológica se resumen en la tabla 4.

Las dos poblaciones se modulan recíprocamente para asegurarse el éxito frente a los microorganismos de vida extracelular o intracelular, ya que para eliminar a unos y a otros el sistema inmune cuenta con mecanismos específicos y eficaces pero contrapuestos. La evidencia acumulada indica que la inapropiada activación de los distintos perfiles promueve enfermedad o limita la respuesta inmune frente a un patógeno en particular. De hecho algunos patógenos desarrollaron mecanismos de evasión en este sentido. El paradigma Th1/Th2 trata de explicar muchos aspectos de la respuesta inmune, pero en muchos otros sólo es una "hipersimplificación" de la situación real donde miles de células e inmunógenos interactúan influenciados por sí mismos, por el medio ambiente, o la genética entre otros factores.

La diferenciación de Th0 a TH1 o Th2 y cualquier otro LT colaborador, no se debe a cambios genéticos sino a cambios fenotípicos funcionales estimulados por factores del microambiente donde se esté dando la respuesta.

Algunas estructuras microbianas reconocidas por células centinelas, como las dendríticas, inducen la secreción de IL-12 que estimula la endocitosis macrófaga. La célula dendrítica madura arriba a la zona T de los órganos linfáticos secundarios secretando IL-12 que se une a receptores presentes en el linfocito Th₀ induciendo su diferenciación a Th1. Por el contrario la IL-4 es la responsable de la diferenciación a Th2 (Figura 11).

Linfocitos T CD4⁺ efectores. Las subpoblaciones derivadas del linfocito Th0 son poblaciones de LT colaboradores efectores dotadas de diferentes perfiles funcionales. La diferenciación no es excluyente, aunque sí predomina uno de los perfiles que hace a la respuesta eficaz frente a un tipo de microorganismo. A continuación se describirán características generales de cada una de ellas.

Linfocitos Th1. Son inducidos principalmente por el potente estímulo que ejerce la IL-12 producida por CD maduras y macrófagos activados. El linfocito Th1 produce las siguientes citoquinas: INF- γ , que induce la activación de células de la inmunidad innata (macrófagos, células NK) y adaptativa (LT CD8⁺ citotóxico), promueve la diferenciación a Th1; IL-2, induce la proliferación de los clones seleccionados y FNT- α , activa al macrófago a la célula NK, favorece la extravasación de células inmunes hacia el foco infeccioso. Este perfil de citoquinas potencia la inmunidad contra microorganismos intravesiculares e infecciones virales. Una vez activados, los linfocitos Th1 cambian su perfil quimiotáctico, salen del órgano linfático secundario y son conducidos por la circulación hacia las inmediaciones del foco infeccioso, se extravasan al tejido y vuelven a reconocer a su epítopo específico sobre la superficie de las CPA, especialmente macrófagos, a los cuales asisten para activarlos y facilitar la eliminación del patógeno fagocitado.

Tabla 4. Propiedades de los linfocitos CD4⁺ Th1 y Th2

Función	Th1	Th2
Producción de citoquinas		
IL-2, INF- γ , FNT- α	SI	NO
IL-4, IL-5, IL-13	NO	SI
IL-10	+	+++
Expresión de receptores de citoquinas		
Receptor de IL-12	++	-
Receptor de INF- γ	-	++
Funciones biológicas		
Activación de macrófago	+++	-
Hipersensibilidad retardada	+++	-
Activación de mastocitos/eosinófilos	-	+++
Induce cambio de isotipo	IgG	IgE, IgG

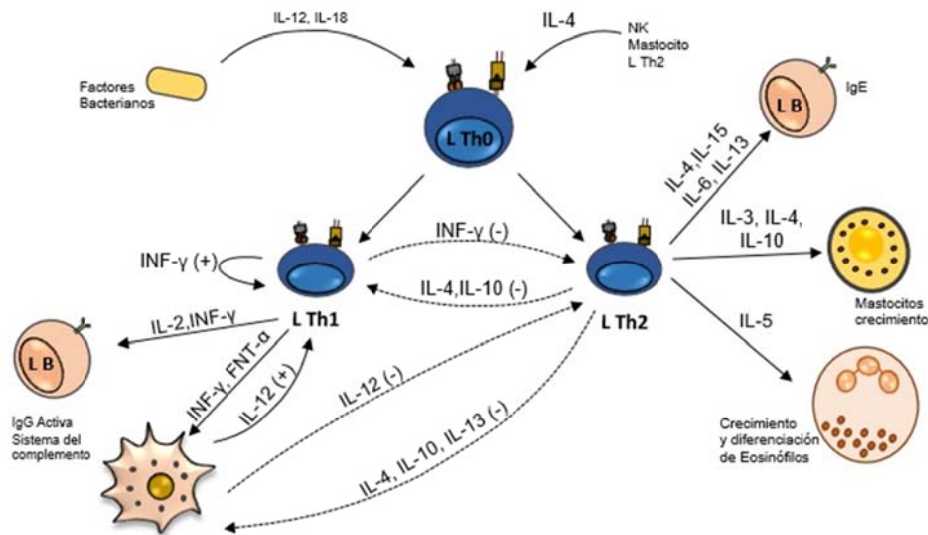


Figura 11. Generación de linfocito Th1 o Th2 y matriz de interacción de citoquinas. Las citoquinas sintetizadas por ambas poblaciones tienen efectos recíprocos entre ellas. El INF- γ liberado por el Th1 inhibe la proliferación del Th2, pero también induce el cambio de isotipo de IgM a subtipos específicos de Ig, como IgG2 e inhibiendo el cambio de isotipo a IgE. En cambio la IL-4 e IL-10 secretadas por los subtipos Th2 inhiben la secreción de IL-12 responsable de la polarización del Th₀ a Th1.

Linfocitos Th2. La IL-4 es la principal citoquina responsable de la diferenciación del linfocito Th₀ en Th2. No está claro que célula la sintetiza; se postuló a los mastocitos, basófilos o NK. En cualquier caso, la síntesis de esta citoquina se da en un contexto de infección parasitaria o frente a distintos alérgenos que inducirían a varios tipos celulares a secretar IL-4. El linfocito Th2 produce las siguientes citoquinas: IL-4 con acción redundante sobre Th₀, favorece el cambio de isotipo a IgE; IL-5 y IL-9 reclutamiento de eosinófilos y mastocitos; IL-13 actúa sobre células epiteliales y musculares promoviendo secreción mucosa e hiperactividad bronquial e IL-25 actúa sobre los linfocitos promoviendo el perfil Th2. Este perfil de citoquinas potencia la inmunidad contra parásitos extracelulares como helmintos y desempeñan un papel central en el desarrollo de reacciones de hipersensibilidad.

Linfocitos Th17. Las principales citoquinas involucradas en la diferenciación de linfocito Th₀ en Th17 son IL-1 e IL-6. Esta subpoblación participa con un papel destacado en la inmunidad frente a bacterias extracelulares e infecciones micóticas, constituyendo una primera línea de defensa en superficies mucosas. Producen las siguientes citoquinas: IL-17, con actividad pro inflamatoria, induce una amplia y masiva extravasación de neutrófilos hacia el foco infeccioso; IL-21 e IL-23 promueven la expansión de los Th17.

Linfocitos Th foliculares. Son los responsables de la colaboración con los LB devenidos en CPA. Asisten al LB en el folículo para proliferar, inducen cambio de isotipo y la diferenciación hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos. No está determinado con certeza qué citoquinas son responsables de esta diferenciación; se postula a IL-21 como una de las responsables. En el apartado de inmunidad humoral se profundiza en su participación en la colaboración T-B.

Linfocitos T reguladores inducibles (iTreg). Representados por un grupo de células que tienen como función eliminar LT autorreactivos y modular la respuesta anti infecciosa. Esta diferenciación tiene lugar en los órganos linfáticos secundarios en el momento de reconocer al antígeno.

Linfocitos T CD8⁺ citotóxicos. Los LT CD8⁺ citotóxicos vírgenes, al igual que los LT CD4⁺, recirculan entre los órganos linfáticos secundarios y los tejidos linfoides asociados a mucosas y se activan al reconocer el péptido antigénico específico presentado sobre la CD madura en el contexto del CMH tipo I. La activación completa de los LT CD8⁺ depende de la activación de los LT CD4⁺. De esta manera los LT CD8⁺ se activan, proliferan y se transforman en células efectoras que salen del órgano linfático hacia el torrente sanguíneo para llegar al foco infeccioso donde desempeñarán su acción. Presentan dos mecanismos de acción: la destrucción de la célula infectada y la producción de citoquinas pro inflamatorias, principalmente INF- γ . Su rol es fundamental en infecciones con microorganismos de vida intracelular como parásitos, bacterias, hongos y virus, al reconocer péptidos antigénicos en el contexto del CMH tipo I en la superficie de la célula blanco.

Inmunidad humoral

Como ya se explicó, del proceso inflamatorio instaurado en el foco infeccioso, la extravasación de líquido de los vasos sanguíneos circundantes, más los cambios promovidos por la acción de las citoquinas pro-inflamatorias, fracciones del complemento y moléculas varias, generan un incremento del líquido intersticial que es vehiculizado por el sistema linfático hacia los órganos linfáticos regionales como linfa. Conjuntamente con la migración de las CD maduras hacia los órganos linfáticos secundarios, son transportados distintos tipos de antígenos (microorganismos enteros opsonizados o no, complejos inmunes varios, macromoléculas, etc.) que llegan por vía aferente hasta los folículos linfáticos donde abundan los LB vírgenes re-circulantes. Las moléculas de bajo peso molecular difunden desde el seno subcapsular hacia el folículo linfoide. Los microorganismos opsonizados o inmunocomplejos con un tamaño mayor son captados a través de receptores y traslocados hacia el interior del folículo por macrófagos subcapsulares. De esta manera los LB vírgenes reconocen mediante su BCR a los epitopes específicos del antígeno. Los LB vírgenes que no encuentran a su antígeno específico en el ganglio linfático, lo abandonan por el conducto eferente, retornan a la sangre por el conducto torácico para seguir recirculando.

Aquel LB que contacta con su antígeno sufre cambios fenotípicos y funcionales. Mientras aumenta la expresión de CCR7 y es conducido al encuentro con el LT CD4⁺ colaborador folicular, activado por una CD en la zona T, el LB endocita al antígeno, lo procesa y lo presenta por la vía exógena. El LT CD4⁺ colaborador folicular cuando se encuentra con un LB devenido en CPA recorre nuevamente la superficie de la célula hasta encontrar su péptido antigénico, el mismo que lo activó sobre la CD. Esta sinapsis inmunológica se da lugar en la interface de la zona paracortical y como resultado de la interacción celular ambas células proliferan. De este primer momento de proliferación algunos LB se dirigen a los cordones medulares del ganglio linfático donde se diferencian a células plasmáticas de vida media corta productoras de IgM. La gran mayoría en cambio, se dirige al interior del folículo y continúa proliferando dando lugar a la formación del centro germinal. Los LB en activa proliferación se denominan centroblastos. Esta estructura presenta otras células con funciones primordiales para la maduración de la respuesta humoral: células dendríticas foliculares, se diferencian de las convencionales por su incapacidad de fagocitar, no expresan CMH tipo II, solo están presentes en el folículo. Tienen receptores de reconocimiento de inmunocomplejos, receptores para el Fc de IgG, IgA e IgM, receptores para fracciones de complemento permitiendo mantener al antígeno capturado en su forma nativa a disposición de los LB con el objeto de probar la especificidad de los BCR editados; Macrófagos, responsables de la eliminación de las células apoptóticas; células fibroblásticas reticulares que conforman una red estructural donde los demás tipos celulares interactúan; LT CD4⁺ colaborador folicular, una vez reactivado en el encuentro con el LB activado con el que interactúa y se adentra en el interior del folículo para continuar con la colaboración T-B modulando la proliferación, el cambio de isotipo y/o enviando señales de supervivencia a los LB del centro germinal.

Los procesos que se llevan a cabo en un centro germinal son los siguientes: a) proliferación de LB; b) hipermutación somática: mutación especial que se da por el corte y empalme al azar en el reordenamiento de los genes de la región variable de las inmunoglobulinas. Proceso concomitante a la proliferación de los centroblastos que editan el BCR con el objetivo de probarlos sobre los antígenos retenidos por las células dendríticas foliculares. Aquellos que finalmente no reconozcan al antígeno con alta afinidad son inducidos a morir por apoptosis. c) selección positiva: esta representa por el acto de rescatar de la apoptosis aquellos clones que hayan reordenado su BCR, con alta afinidad por el antígeno y puedan continuar su diferenciación hacia célula plasmática productoras de inmunoglobulinas de alta afinidad hacia los diferentes constituyentes del patógeno actuante. d) Cambio de isotipo: evento estimulado por el LT CD4⁺ colaborador folicular. Las primeras inmunoglobulinas en producirse luego del primer contacto en la colaboración T-B son de isotipo IgM, pero a medida que progresa la respuesta y como resultado de los eventos en el centro germinal y de la ubicación del órgano linfático secundario en relación a la puerta de entrada del microorganismo, las inmunoglobulinas son del isotipo G, A o E. En la figura 12 se esquematiza una inmunoglobulina y sus componentes.

El producto del centro germinal son los plasmoblastos y los LB de memoria. Los LB de memoria son fenotípicamente diferentes a los vírgenes, presentan BCR de isotipo distinto al M y de alta afinidad por su antígeno, presentan elevados niveles de moléculas de CMH tipo II en su superficie, características que favorecen su rápida respuesta frente a las re-infecciones. Son liberados a la circulación y patrullan los distintos órganos linfáticos en busca de un segundo encuentro con el antígeno que les dio origen. En cambio los plasmoblastos atraídos quimiotácticamente se dirigen a la médula ósea donde se alojan y maduran a célula plasmática productora de anticuerpos de alta afinidad.

Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas producidas por células plasmáticas, con función inmune diferencial según su isotipo. Son los receptores de reconocimiento solubles de la inmunidad adaptativa. Se las puede definir como bifuncionales en estrecha relación con su estructura. La estructura de un monómero se puede apreciar en la figura 12. La región Fab reconoce específicamente composición química y distribución espacial de un epítopo presente en el antígeno. La región Fc es reconocida por diferentes efectores de la inmunidad innata y adaptativa sólo si está formando parte de un inmunocomplejo. Su función primordial es neutralizar al microorganismo o sus productos metabólicos, como las toxinas. Evita la adhesión de los microorganismos a su célula blanco por bloqueo directo o interferencia espacial con sus receptores. La IgG interviene en el proceso de opsonización, mecanismo por el cual los anticuerpos unidos específicamente a un antígeno marcan al mismo para ser más fácilmente reconocido por células efectoras de la inmunidad: fagocitos, células NK, linfocitos CD8⁺

citotóxicos. Algunos isotipos como IgM o IgG son reconocidos por el sistema del complemento y pueden activarlo por la vía clásica.

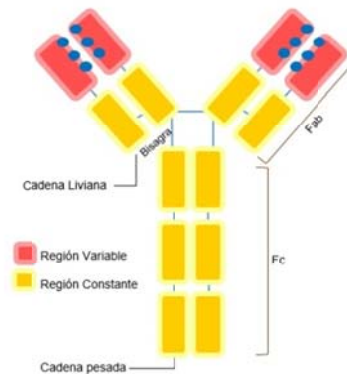


Figura 12. Estructura de un monómero de inmunoglobulina. Fab: sitio de unión al antígeno (*Fragment antigen binding*). Fc: fracción cristalizable.

Antígenos e inmunógenos

Este libro está pensado para conocer a los microorganismos más frecuentes que afectan a los animales y algunos también pueden afectar a otras especies, entre ellas los humanos. En este capítulo vamos a describir a estos microorganismos desde el punto de vista inmunológico, mirada que nos va a ayudar a comprender su utilización en vacunas y en pruebas diagnósticas.

Podemos definir a los inmunógenos como sustancias o moléculas que introducidas en el organismo de un vertebrado superior adulto inducen una respuesta inmune celular y humoral, con la generación de anticuerpos y células que tienen la capacidad de reconocer específicamente al inmunógeno que las generó. En cambio, un antígeno es una molécula o sustancia capaz de ser reconocida por el producto de una respuesta inmune, anticuerpos (Ac) y células específicas pero por definición no tiene capacidad inmunogénica, no es capaz de inducir una respuesta inmune. No tiene poder inmunogénico. Son ejemplo de antígenos los haptenos, antígenos constituidos por un solo determinante antigénico o epítopo. La palabra antígeno deriva de antiseromatógeno y del inglés **antibody generation**. De todos modos se suele referir a las denominaciones de antígeno e inmunógeno como sinónimos. Desde el punto de vista inmunogénico, los microorganismos son mosaicos antigénicos y presentan en sus estructuras numerosos y variados antígenos.

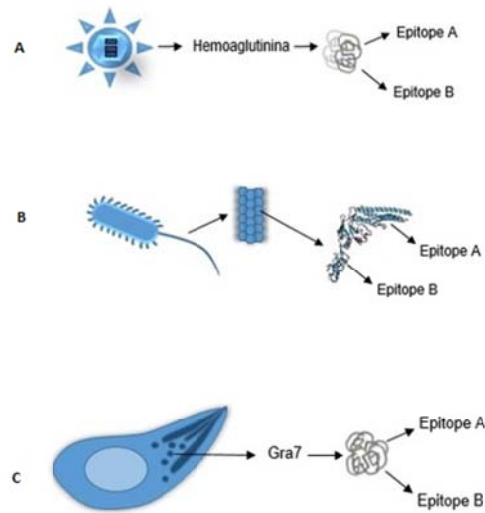


Figura 13. Esquema de bacterias, virus y parásitos como ejemplo de mosaicos antigénicos, donde cada molécula proteica, de hidrato de carbono, lipídicas, etc., combinadas o no, complejas o no, estructurales o no, representan para el sistema inmune, un conjunto de antígenos/inmunógenos, ensamblados extraños y potencialmente dañinos. A: virus; B: bacteria flagelada, La unidad proteica del flagelo es la flagelina, la cual presenta 2 secuencias aminoacídicas. C: parásito apicomplexa.

Una de las características de la inmunidad adaptativa es su capacidad de dejar memoria del contacto con el microorganismo. Como se explica en el capítulo 3, es la base que fundamenta la aplicación de una vacuna para generar, de forma artificial, memoria inmune protectora. Al microorganismo entero o sus elementos más inmunogénicos podemos utilizarlos como el componente activo de una vacuna o para hacer diagnóstico de la enfermedad que causan. En los capítulos de este libro se hace referencia a los tipos de vacunas y a las pruebas serodiagnósticas más utilizadas para cada bacteria o virus. Los inmunógenos utilizados en las vacunas así como los antígenos diagnósticos deben cumplir con ciertas características que comentan a continuación.

Los inmunógenos deben cumplir con ciertos requisitos para ser buenos inductores de una respuesta inmune, siendo las proteínas los mejores inmunógenos. Algunos de los factores que influyen en la inmunogenicidad de una molécula son:

- **Peso molecular (PM).** Los mejores inmunógenos son las proteínas y los hidratos de carbono. El PM es un buen indicador de inmunogenicidad ya que una molécula de mayor PM potencialmente puede contener más epitopes que una molécula de bajo PM. Un inmunógeno debe pesar como mínimo 10 kDa. Las moléculas de PM no muy elevados pueden ser excretados rápidamente y no ser capaces de inducir una respuesta. Igualmente existen proteínas de alto PM que por la carencia de otros factores de inmunogenicidad no son buenos inmunógenos, por ejemplo la gelatina.
- **Composición química.** En las proteínas, ciertos aminoácidos se relacionaron con el aumento de la inmunogenicidad, por ejemplo tirosina, fenilalanina y aquellos que

contienen grupos aromáticos. Las proteínas que presentan mayor porcentaje de L-aminoácidos en su constitución son más inmunogénicas.

- Exogenicidad o característica de extraño. Esta dada por la distancia filogenética entre la especie que aporta el antígeno (ej. una bacteria) y la especie que recibe al antígeno, en este caso siempre va a ser un vertebrado superior. A mayor distancia filogenética, mayor disparidad molecular, hidratos de carbono de composición extraña o combinaciones extrañas de aminoácidos que no están presentes en el hospedador, por lo que el antígeno/inmunógeno será reconocido como una molécula extraña lo que generará una respuesta inmune de mayor intensidad. Por lo tanto a mayor distancia filogenética entre en antígeno/inmunógeno y el hospedador, mayor respuesta inmune.
- Degradabilidad. Las moléculas extrañas que son muy inestables o que se destruyen rápidamente no son buenos inmunógenos. El almidón, glucagón y los lípidos son moléculas que se metabolizan rápidamente. El acero quirúrgico es un elemento que no puede ser degradado por lo que no genera respuesta inmune. Para generar una respuesta inmune los antígenos deben ser capaces de ser degradados parcialmente para que estas fracciones puedan ser presentadas y reconocidas por las células del sistema inmune adaptativo.
- Rigidez. Una molécula antigénica debe mantener su estructura espacial estable para poder ser reconocido por los receptores del sistema inmune. Las proteínas al presentar uniones por interacción iónica entre sus aminoácidos o puentes bisulfuro mantienen su estructura estable. Las grandes moléculas de ácidos grasos presentan largas cadenas de hidrocarburo que se distorsionan fácilmente sufriendo alteraciones en sus estructura transformándose en malos antígenos.

Estructura de un antígeno/inmunógeno

Los antígenos están formados básicamente por un soporte o *carrier* y epitopes. El epitope o determinante antigénico es la zona o región del antígeno que determina la especificidad, es la secuencia de las unidades estructurales de la molécula antigénica que es reconocida por los receptores del sistema inmune adaptativo (Figura 14).



Figura 14. Esquema de un antígeno y sus componentes. En una proteína, las unidades estructurales son los aminoácidos. En una estructura compleja como el lipopolisacárido de las bacterias gramnegativas, las unidades estructurales de la cadena O son los hidratos de carbono que la componen.

Las proteínas, mencionadas como los mejores inmunógenos, presentan determinantes antigénicos que se pueden clasificar según la disposición de sus aminoácidos en la estructura proteica: a) Epitopes continuos: también llamados lineales, son aquellos que están formados por una secuencia de aminoácidos que se encuentran dispuestos uno al lado del otro en los cuatro niveles estructurales de una proteína. Cuando se los encuentra incluidos en la proteína en estado nativo pueden ser reconocidos por los LB. Cuando estos epitopes forman parte de las fracciones que se encuentran unidos a la molécula del CMH tipo 1 o 2 y expuestos en la superficie de células presentadoras de antígeno pueden ser reconocidos por los LT. b) Epitopes discontinuos: también llamados conformacionales son aquellos epitopes que están formados por 2 pequeñas secuencias de aminoácidos que en la estructura primaria se encuentran separadas, pero por el plegamiento que sufre la proteína a partir de su estructura terciaria se yuxtaponen y se forma un determinante conformacional. Estos solo se encuentran presentes en la estructura nativa, por lo tanto son reconocidos solamente por los LB (Figura 15).

Los epitopes también se pueden clasificar según su ubicación en la molécula del antígeno: a) Epitopes superficiales: son los que están expuestos al medio líquido que los contiene, por lo tanto son hidrofílico. Normalmente son los primeros en ser reconocidos por el sistema inmune. b) Epitopes profundos: son aquellos que se ubican en secuencias que quedan incluidas dentro de la molécula antigénica por el plegamiento de la misma.

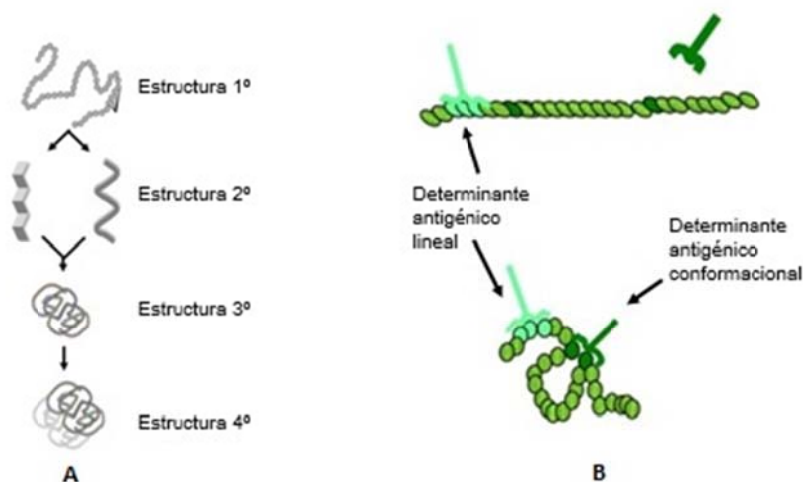


Figura 15. Descripción grafica de las niveles estructurales de una proteína. Ubicación y reconocimiento de los epitopes continuos y/o conformacionales. En la figura A se grafican los distintos grados estructurales de una proteína. Estructura proteica primaria: formada por la secuencia de aminoácidos. Estructura proteica primaria: está dada por los plegamientos que provocan las uniones por puentes de hidrógeno en α hélice y hoja β . Estructura proteica terciaria: ocurre cuando se dan ciertas interacciones entre α hélice y hoja β , generando la forma globular tridimensional. Estructura proteica cuaternaria: aparece cuando se conjugan una o más subunidades proteicas. En la figura B se puede observar que los epitopes conformacionales solo pueden mantener esta condición en una estructura terciaria, al perderse esta también se pierde el epitope conformacional

También se pueden clasificar en accesibles, inaccesibles, solapados, etc. Los epitopes se clasifican según su capacidad inmunogénica: a) Inmunodominantes: son aquellos que por alguna razón están más expuestos, presentan una composición química fuertemente

antigénica o están en mayor número, combinaciones de las anteriores e inducen una fuerte respuesta inmune. b) Inmunosilentes: no inducen respuesta inmune o es pobre o bien, despreciable.

Se denomina antígeno diagnóstico a aquel reactivo que se utiliza en pruebas serodiagnósticas para determinar la presencia de anticuerpos específicos en un suero problema de un animal sospechado de padecer o haber padecido una enfermedad determinada.

Los antígenos diagnósticos se pueden clasificar en particulados o solubles. Los particulados son aquellos que conservan su estructura original de mosaico antigénico y tienen un gran tamaño, son ejemplos todas las células. Pueden ser microorganismos enteros, vivos como leptospiras de cultivo fresco para la prueba de microaglutinación (MAT). Normalmente son microorganismos muertos o inactivados por agentes físico químicos como *Brucella abortus* cepa 1119 muerta por calor para todas las pruebas de aglutinación de brucelosis, otro ejemplo son los taquizoitos de *Toxoplasma gondii*, para la prueba de microaglutinación en placa. Es importante destacar que el tratamiento que sufren estos microorganismos deben mantener los componentes antigénicos para ser buenos antígenos diagnósticos y poder evidenciar la presencia de anticuerpos específicos.

Los antígenos solubles son aquellas partículas antigénicas capaces de mantenerse en suspensión en medio líquido o gelificado, que tienen como característica su bajo peso molecular. Ejemplos de antígenos solubles: partículas virales enteras inactivadas y sus componentes; proteínas del antígeno VÍA o antígeno asociado a la infección para el diagnóstico de Aftosa; proteína p26 para el diagnóstico de AIE; extracto bacteriano de *Brucella ovis* para diagnóstico de epididimitis ovina y brucelosis canina. También se utilizan proteínas recombinantes como antígenos diagnósticos para muchas enfermedades.

Para las pruebas terciarias tanto en la seroprotección como es la seroneutralización el inmunógeno debe estar activo.

Referencias

- Abbas, Abul, Litchman Andrew, Pillai Shiv. 2012. Inmunología Celular y Molecular. 2009. 6ta Edición Saunders.
- Acheson DW and Luccioli S. Mucosal immune responses. 2004. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology Volume 18, Issue 2, Pages 387-404. doi.org/10.1016/j.bpg.2003.11.002
- Fainboim L., Geffner J. Introducción a la Inmunología Humana. 2013. 5ta Edición. 2da reimpr. Ed. Medica Panamericana.
- Galli S, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. 2005. *Nature Immunology* **6**, 135 – 142. doi:10.1038/ni1158
- Gomez-Lucia E., Blanco M., Doménech A. (2007). Manual De Inmunologia Veterinaria. Ed : Pearson-Prentice-Hall. ISBN: 9789701035627
- Gyles C L, Prescott J F, Songer J G and Thoen C O. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, Fourth Edition Ed. 2010 Blackwell Publishing ISBN: 978-0-813-81237-3
- Hoebe K, Janssen E and Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity *Nature Immunology*. 2004. 5, 971 – 974. doi:10.1038/ni1004-971
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C and Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity *Nature Reviews Immunology*. 2011. 11, 519-531. |doi:10.1038/nri3024
- Mathern D and Heeger P. Molecules Great and Small: The Complement System. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015 Sep 4; 10(9): 1636–1650. 2015. doi: 10.2215/CJN.06230614
- Murphy K, Travers P y Walport M. Inmunobiología de Janeway, 7ma 2009. Edición Ed. McGrawHill.
- Oppenheim J J, Biragyn A, Kwak L W, Yang D. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. 2003. *Ann Rheum Dis* ;62(Suppl II):ii17–ii21
- Pennimpede EFF, Gomez CM, Stanchi NO. Introducción a la Inmunobiología. 1er Edición. 2004. Ed. EDULP
- Tizard I. R. Inmunidad en el feto y en el recién nacido. En Tizard IR Introducción a la inmunología Veterinaria. 8Va Edición. Barcelona España. Ed. Elsevier, 2009, p. 223-238.
- Vidya MK, Kumar VG, Sejian V, Bagath M, Krishnan G, Bhatta R. Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. 2017. *Int Rev Immunol*. 13:1-17. doi: 10.1080/08830185.2017.1380200.
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T and Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nature Immunology* 2008. **9**, 503 - 510 (2008) doi:10.1038/ni1582.

Takaoka A and Yanai H. Interferon signalling network in innate defence. 2006. Cellular microbiology. Volume 8, Issue 6 Pages 907–922 DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00716.x

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, and Locatelli M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. 2004. Trends in Immunology Volume 25, Issue 12, Pages 677-686 doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015

CAPÍTULO 3

Vacunas en veterinaria

Eduardo Mórtola

Las vacunas veterinarias son primordiales para la salud y el bienestar animal, la producción de alimentos y la salud pública. Constituyen un método rentable para prevenir enfermedades en los animales, mejorar la eficiencia en la producción de alimentos y reducir o prevenir las enfermedades zoonóticas y las transmitidas por alimentos. Sería imposible producir suficientes proteínas animales para nutrir a los casi 7 mil millones de personas en la tierra, sin vacunas para prevenir las epizootias en los animales productores de alimentos. Sin las vacunas para animales de compañía (especialmente vacuna contra la rabia), muchas personas no mantendrían una mascota en su hogar y no experimentarían la satisfacción del vínculo humano/animal. Las enfermedades zoonóticas como la brucelosis y la leptospirosis serían mucho más frecuentes sin el uso de vacunas.

Antecedentes

Las prácticas sanitarias que incluyen el uso de tratamientos y medidas profilácticas específicas, como la vacunación entre otras contribuyeron en reducir, e incluso erradicar, algunas enfermedades infecciosas sea a nivel local, áreas, países, continentes e incluso mundialmente, como es el caso de la viruela.

La vacunación se inicia prácticamente en el siglo XVIII. El médico y biólogo británico Edward Jenner, nacido en 1749, es considerado hoy en día como el padre de la inmunología. Jenner observó que las vacas padecían una enfermedad llamada viruela, que producía erupciones en las ubres semejantes a las que produce la viruela humana. En ocasiones, contagiaban la enfermedad a las mujeres que las ordeñaban, en quienes aparecían pústulas en sus manos. Por fortuna, era una dolencia de carácter benigno y los afectados se recuperaban rápidamente. Pero lo que verdaderamente llamó la atención de Jenner fue que estas personas se volvían inmunes contra la viruela humana. Por lo cual decidió inocular a una persona sana con la viruela de las vacas para conferirle inmunidad frente a la terrible enfermedad. En 1796, extrajo pus de una pústula de la mano de Sarah Nelmes, una ordeñadora que había contraído

la viruela de su vaca lechera y lo inoculó a un saludable niño de 8 años llamado James Phipps. El pequeño desarrolló una forma leve de la enfermedad entre el 7º y el 9º día posteriores a la inoculación. Se formó una vesícula en los puntos de inoculación, que desapareció sin la menor complicación. A los dos meses, inoculó al niño con la temida viruela, y no enfermó, había descubierto "*La primera Vacuna*".

Los científicos de la época, e incluso la Asociación Médica de Londres, se opusieron al tratamiento de Jenner y, en muchas ocasiones, realizaron críticas violentas e injuriosas. Finalmente, su vacunación acabó imponiéndose, aunque hoy en día sus métodos de experimentación serían inaceptables por contravenir los principios de la ética médica. Desde la época de Jenner, pasando por Louis Pasteur, quien inició sus trabajos sobre vacunas, sin conocer nada de la inmunología - de hecho los anticuerpos fueron descubiertos recién treinta años después - y hasta un par de décadas atrás, el enfoque para el desarrollo de vacunas fue casi estrictamente microbiológico. Los microbiólogos identifican primeramente al agente que causa la enfermedad infecciosa y lo atenúan para que cuando se administre como vacuna genere una inmunidad protectora en el individuo sin causarle enfermedad. Este enfoque, que se utilizó durante más de 100 años, no ahonda en los principios por los que estos microorganismos atenuados inducen inmunidad protectora en el hospedador receptor de la vacuna. Los posteriores estudios en vacunología, centraron la atención no sólo en el microorganismo en cuestión, sino en la identificación de los antígenos protectores, los adyuvantes necesarios para promover, conjuntamente con el inmunógeno, inmunidad protectora y los tipos de células B, células T y otras respuestas inmunológicas necesarias para proporcionar una protección eficiente. De este modo, la biología de la vacuna se movió desde un enfoque más o menos empírico hacia uno altamente inmunológico, en el que día a día se trata de delinear una serie de vías fascinantes.

Vacuna y vacunación

Una definición sobre vacuna puede ser amplia y en ocasiones complicada si queremos abarcar todas sus variantes en un sólo concepto. Sin embargo, su sentido inmunológico actual, debería encuadrarse en los siguientes términos: toda suspensión de microorganismos en distinto estado biológico, soluciones de sus metabolitos detoxificados, combinaciones de ambos o bien partes estructurales de aquellos, con el agregado o no de adyuvantes, que inoculadas a los vertebrados adultos en las condiciones adecuadas los protegen de la infección, la enfermedad o bien reducen sus consecuencias por inducir un estado de inmunidad activa artificial que se traduciría en una protección sobre el hospedador cuando toma contacto con ese mismo microorganismo por segunda vez.

Vacunar es inocular un producto biológico que, en forma de una agresión controlada, provoca en el hospedador un grado de reactividad individual que se traduce, el mejor de los casos, como una protección eficiente. La finalidad de la vacunación es la protección del

individuo antes de que este tome contacto con el patógeno del medio. La magnitud de la protección está en relación con la capacidad de respuesta; es por ello que la respuesta inmune inducida nunca confiere protección absoluta ni es igual en todos los integrantes de la población. La protección individual es importante en los animales de compañía o de alto valor económico o afectivo, pero en producción animal, la importancia radica en la inmunidad poblacional.

Es necesario establecer que el éxito o el fracaso de la lucha contra las enfermedades infecciosas no depende solamente de la inmunización efectiva sino también de otras medidas de manejo que la complementan (higiene, aislamiento, ventilación, desinfección, etc.), facilitando el control y erradicación de la enfermedad.

Tipos de vacuna y protección conferida

De acuerdo al tipo de vacuna elaborada, puede proteger contra la infección, la enfermedad, atenuar los signos o curar una enfermedad establecida.

- **Proteger contra la infección** refiere a que por el efecto de la vacuna, se impida el ingreso y colonización del agente infeccioso en el individuo. Sin lugar a dudas, es este el objetivo buscado en toda vacuna, involucra la estimulación, por parte de la vacuna, de mecanismos específicos efectores de la inmunidad en los puntos de entrada de los patógenos, como por ejemplo la IgA secretoria con efecto neutralizante y antiadherente que impediría la adhesión de los microorganismos a las mucosas. Pero la inducción de esta inmunoglobulina por medio de la vacunación, necesita de ciertas condiciones esenciales como son: persistencia del inmunógeno, utilizar una vía de inoculación igual o similar a la empleada por el patógeno simulando una infección natural. Ejemplo de vacunas de este tipo en medicina veterinaria es la utilizada contra *Bordetella bronchiseptica* en caninos, viva atenuada de uso intranasal. También algunas vacunas utilizadas en aves.
- **Prevenir la enfermedad**, con este tipo de vacunas no se logra evitar la colonización del hospedador por parte del agente patógeno, pero si la aparición de la enfermedad por el efectos de anticuerpos circulantes y/o células específicas que bloquean o eliminan al microorganismo. Estas vacunas se administran generalmente por vía parenteral y representan la mayoría de las vacunas que se utilizan en medicina veterinaria.
- **Reducir o atenuar los síntomas**, estas vacunas generalmente relacionadas con afecciones respiratorias, ya sean bacterianas (pasteurelosis) o virales como la influenza equina, las cuales no previenen la enfermedad pero si atenúan significativamente los síntomas.

Finalmente, las vacunas terapéuticas o autovacunas que se emplean como tratamiento y que serán definidas más adelante.

Características esenciales de las vacunas

Condiciones básicas que deben reunir las vacunas

Seguridad: posterior a la administración de una vacuna, en el hospedador no deben producirse manifestaciones locales o generales indeseables asociadas con el poder patógeno del microorganismo en cuestión – **las vacunas no deben enfermar** - .

Pureza: ausencia de productos y/o microorganismos extraños en la preparación del biológico (sean o no peligrosos para el individuo, dañinos para el producto o puedan afectar la seguridad, potencia o eficacia de la vacuna.

Potencia: capacidad del producto biológico en generar una respuesta inmune de la magnitud necesaria para proteger al individuo. El ensayo de potencia relaciona la capacidad inmunogénica de la vacuna con la dosis que demostró ser eficaz.

Eficacia: habilidad y capacidad específica de una vacuna en proteger a los vacunados de la enfermedad en cuestión o reducir sus consecuencias, empleada en las condiciones estipuladas por el fabricante.

Atributos que deben tener las vacunas

Proteger. La protección debe ser prolongada, contra la infección y/o enfermedad, mediante la inducción de una respuesta inmune adecuada que la asegure.

No provocar accidentes vacunales. Los accidentes vacunales son aquellos dependientes del sustrato activo de la vacuna. Ej. reversión al poder patógeno original de cepas atenuadas; presencia de agentes adventicios; incorrecta inactivación del sustrato, etc. Las lesiones vacunales son reacciones adversas locales o generales que dependen de componentes inespecíficos de las vacunas como adyuvantes, conservantes, etc.

No poseer poder patógeno residual. Sin embargo, algunas vacunas, como la de brucelosis bovina (Cepa 19), produce orquitis en toros por lo que está contraindicado el uso en machos; o la vacuna contra la hepatitis canina (adenovirus canino tipo 1 ADV-1) que producía glomerulonefritis, opacidad de córnea (enfermedad del ojo azul); etc. por lo que se dejó de emplear esa cepa de virus en la formulación de la vacuna.

No deben propagarse los sustratos activos o vivos. No deben excretarse de los animales vacunados por la posibilidad de animalizarse, recuperar su poder patógeno original e infectar.

Ser de bajo costo. Para su aplicación masiva y poder controlar la enfermedad a nivel poblacional.

Clasificación de vacunas

Existen varias clasificaciones de vacunas. Una primera clasificación general las divide de acuerdo al procedimiento de elaboración en:

- **vacunas convencionales:** elaboradas con una tecnología tradicional, que no involucra modificaciones genéticas del agente.
- **vacunas de nueva generación:** las cuales no están formuladas con el microorganismo completo, sino con parte de ellos o modificaciones en su genoma, producto de técnicas de ingeniería genética.

Las vacunas convencionales pueden clasificarse de acuerdo a su sustrato inmunogénico, finalidad, especificidad, valencia, estado biológico y vía de inoculación.

Sustrato inmunogénico

Bacterianas: son vacunas formuladas con bacterias como inmunógenos. Puede ser el soma bacteriano, (ej. leptospira, brucela, etc.); toxinas bacterinas detoxificadas (ej. toxinas tetánicas); vacunas combinadas con soma y toxinas, también llamadas anavacunas (ej. gangrenas ovina y bovina); esporovacunas (ej. carbunco bovino); vacunas formadas por partes o fracciones de las bacterias (ej. vacuna contra la adenitis equina cuyo sustrato inmunogénico es la proteína M del *Streptococcus equi*; contra queratoconjuntivitis o diarreas neonatales de los bovinos a base de pills de *Moraxella bovis* y de *Escherichia coli*, respectivamente, etc.).

Víricas: formadas por partículas virales completas (ej. contra la fiebre aftosa, influenza equina, peste porcina clásica); o por fracciones proteicas del virus, estas últimas generalmente elaboradas por biotecnología y consideradas como vacunas de nueva generación (ej. contra parvovirus, moquillo, etc)

Parasitarias: son vacunas poco comunes en veterinaria y algunas de eficacia cuestionada. (ej. vacuna contra tricomoniasis, hidatidosis, coccidiosis de las aves, etc.)

Finalidad

Profilácticas: son las vacunas destinadas a la prevención de una enfermedad, de producción y uso masivo y realizadas generalmente a partir de cepas de referencia o zonales provistas por la autoridad competente (SENASA) (ej. contra la rabia, aftosa, parvovirus, etc.). El objetivo de estas vacunas es controlar una enfermedad y en el mejor de los casos eliminarla o erradicarla, proceso que se logra conjuntamente con un plan de erradicación que articula manejo, diagnóstico y vacunación.

Metafilácticas: su aplicación tiende a impedir o limitar la difusión de una enfermedad. También se la conoce como vacunaciones de urgencia. Un ejemplo de ella la constituye la vacunación en anillo contra la fiebre aftosa o en mortandades por carbunco.

Terapéuticas: son autovacunas que se elaboran con la o las cepas procedentes de un animal o grupo de animales a los que está destinada la vacuna (Ej. contra mastitis bovina, otitis canina, papilomatosis bovina, etc.). Debemos señalar que algunas vacunas profilácticas también pueden emplearse con una finalidad terapéutica (Ej. vacuna contra vibriosis en los toros).

Especificidad del inmunógeno¹

Homólogas: se elaboran con el mismo agente etiológico que produce la enfermedad que se desea prevenir (ej. leptospirosis, aftosa, distemper canino, etc.).

Heterólogas: producida con microorganismos que si bien no son la etiología específica de la enfermedad, comparten con ella inmunógenos similares (ej. adenovirus tipo 2 para prevenir la hepatitis infecciosa bovina).

Valencia del inmunógeno y número de inmunógenos presentes

Monovalentes: presentan un sólo tipo o variedad del agente etiológico específico (ej. vacuna contra la rabia, brucelosis, etc.).

Polivalentes: incluyen más de un tipo o variedad del agente etiológico (ej. contra la fiebre aftosa, influenza equina, etc.). Generalmente se identifican por el número de valencias presentes (ej. vacuna bivalente de encefalomiелitis equina con virus Este y Oeste, vacuna tetravalente contra fiebre aftosa, etc).

Asociadas o combinadas: son vacunas que llevan 2 o más inmunógenos y protegen contra varias enfermedades (ej. vacuna contra mancha, gangrena enterotoxemia, las combinadas para pequeños animales que contiene diferentes inmunógenos vacunales de diferentes patógenos).

Estado biológico

Vacunas vivas atenuadas

Consisten en preparaciones de microorganismos que pueden replicar *in vivo* en el hospedador de forma similar al microorganismo nativo, originando una infección inaparente o

¹Inmunógeno: componente de un patógeno que tiene la capacidad de inducir una respuesta inmune y ser reconocido por el producto de esa respuesta inmune (anticuerpos y células efectoras)

con signos mínimos, provocando con ello una respuesta inmune, celular y humoral, similar aunque algo inferior a la que ocurre en la infección natural. La atenuación del microorganismo, mediante pases sucesivos en diferentes hospedadores animales o medios de cultivo, es lo que garantiza la eliminación de la capacidad de inducir enfermedad; pero su gran inmunogenicidad provoca generalmente protección a largo plazo y con un mínimo de dosis.

Las ventajas de estas vacunas son:

- No se alteran sus inmunógenos esenciales.
- Pueden cubrir variaciones antigénicas.
- No requieren adyuvantes.
- Son muy inmunogénicas porque el sustrato se multiplica en el receptor.
- Generan rápida respuesta inmune mediada por anticuerpos y células.
- Pueden estimular respuestas inmunes a nivel de las mucosas, dependiendo de la vía de administración.
- Inducen protección prolongada con una sola dosis.

Las desventajas son:

- Posible patogenicidad residual.
- Presencia de agentes adventicios.
- Riesgo de reversión al poder patógeno original.
- No se recomienda su aplicación en animales preñados, inmunodeficientes o especies salvajes.
- Mayor exigencia para su conservación.
- Pueden propagarse a otros animales.

Vacunas inactivadas

Las vacunas muertas o inactivadas se componen de microorganismos inactivados, térmica o químicamente, o bien fracciones o subunidades de los mismos, incapaces de reproducirse y por ello incapaces de producir la enfermedad en el hospedador o de transmitirse a otro animal. Son vacunas generalmente bien toleradas y seguras. Desde el punto de vista inmunológico, son menos inmunogénicas que las vacunas vivas, requiriendo adyuvantes, la administración de una primera dosis y posteriormente varias dosis de refuerzo tienen por finalidad aumentar y mejorar la protección.

Por lo general, estimulan fundamentalmente la inmunidad humoral y eventualmente con el uso de uno o varios adyuvantes pueden estimular también la inmunidad mediada por células.

Las ventajas de estas vacunas son:

- Son seguras, no causan enfermedad y carecen de patogenicidad residual.
- No hay riesgo de propagación.
- No revierten al poder patógeno original.

- Pueden aplicarse en hembras preñadas y especies salvajes.
- Menos exigentes en cuanto a su conservación.

Las desventajas son:

- Pueden alterarse los inmunógenos esenciales.
- Menor poder inmunogénico que las vacunas vivas ya que carecen de la capacidad de multiplicarse y necesitan mayor concentración de inmunógenos.
- Generalmente la respuesta inmune es sólo mediada por anticuerpos.
- Deben aplicarse varias dosis y por lo tanto pueden producirse fenómenos de hipersensibilidad.
- Requieren la incorporación de adyuvantes para aumentar la magnitud y el tipo de respuesta inmune.

Vía de aplicación

- Naturales: la vía de aplicación son las mucosas (oral, nasal o conjuntival) y el estado biológico debe ser activo o vivo. Al simular la entrada del agente como ocurre en la infección natural, estas vacunas tienen la capacidad de inducir la producción de IgA secretoria, previniendo la posterior infección del animal. Pueden ser de uso individual o masivo sobre todo en aves (vía nasal por aerosoles o vía oral en agua de bebida).
- Parenterales: la vía de aplicación es subcutánea, intramuscular o intradérmica. El estado biológico puede ser vivo o muerto, generalmente inducen la producción de IgM o IgG circulantes y si bien no previenen la infección, impiden el desarrollo de la enfermedad.

Importancia o necesidad de aplicación

- Vacunas core o centrales: son las vacunas destinadas a la prevención de las enfermedades causantes de mayor mortalidad en la especie, en una determinada edad; también se consideran vacunas centrales aquellas destinadas a prevenir enfermedades zoonóticas o aquellas que son obligatorias por disposiciones gubernamentales. Ejemplo de estas vacunas son rabia, parvovirus, distemper canino, aftosa, carbunco, etc.
- Vacunas periféricas: son todas aquellas vacunas que deben o pueden aplicarse además de las centrales. Es requerida su aplicación, solamente, en aquellos animales cuya ubicación geográfica, ambiente local o estilo de vida los pone en

riesgo de contraer infecciones específicas. Ejemplo de estas vacunas son: tos de las perreras, adenitis equina, salmonelosis en bovinos, etc.

- No recomendadas: son aquellas vacunas que si bien existen en el mercado, no es recomendado su uso por las organizaciones profesionales académico/científicas, por ejemplo la WSAVA (*World Small Animal Veterinary Association*). Este tipo de vacunas no poseen pruebas científicas suficientes que justifiquen su utilización.

Vacunas de nueva generación

Los avances en el conocimiento de la respuesta inmune y en las técnicas de biología molecular conseguidos en los últimos años, permitieron identificar proteínas y sus funciones en la patogenia en un gran número de agentes infecciosos. Esto permitió identificar las proteínas relacionadas con la virulencia, sean o no inmunogénicas. Con esta información la estrategia del diseño de las vacunas de nueva generación se enfocó en el desarrollo de vacunas que no contienen al agente infeccioso completo y permitan, entre otras ventajas, la diferenciación serológica de los animales vacunados frente a los infectados. Estas vacunas son denominadas DIVA por su sigla en inglés de '*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*, "diferenciando animales infectados de vacunados",

La estrategia para la obtención de estas vacunas de nueva generación, se basa en la identificación de la proteína o proteínas de un agente infeccioso capaces de inducir una respuesta inmune protectora de forma semejante a la que induciría el agente infeccioso completo; así como la identificación de aquellas proteínas que no tienen interés inmunológico ni replicativo o que pudieran estar relacionadas con la virulencia y por tanto prescindibles en una vacuna. De esta manera y mediante técnicas de ingeniería genética, se pueden seleccionar los genes correspondientes, clonarlos y expresarlos en diferentes sistemas o eliminarlos mediante una delección selectiva. Otra variante de este sistema sería, una vez identificada la proteína de interés inmunológico, la obtención de la proteína o proteínas por síntesis proteica.

Otra característica importante en la estrategia de obtención de estas nuevas vacunas es la posibilidad de incorporar, además de las proteínas de interés inmunológico, secuencias de otros antígenos que puedan aumentar la estimulación de la respuesta inmune.

En base a las diferentes metodologías utilizadas (recombinación, delección génica) o al tipo de producto obtenido (proteínas inactivas, vacunas atenuadas-delecionadas, recombinantes) se pueden clasificar las vacunas de nueva generación, en replicativas y no replicativas. Las replicativas incluyen vacunas vivas delecionadas y a recombinantes vivos; las no replicativas, vacunas a subunidades, vacunas a proteínas sintéticas, vacunas antiidiotipo y vacunas a ADN. Existen actualmente a nivel experimental vacunas comestibles.

Vacunas vivas delecionadas

El avance tecnológico y la ingeniería molecular permitieron el desarrollo de vacunas recombinantes, mediante la identificación en el genoma de ciertos genes que codifican para proteínas relacionadas con la patogenicidad del agente. De esta manera, se crearon en el laboratorio virus y bacterias con modificaciones genéticas donde los genes relacionados con la patogenicidad se encuentran delecionados, pero conservan componentes que mantienen su poder inmunogénico, o sea, su capacidad de generar una respuesta inmune protectora. Las mismas técnicas se utilizan para virus y bacterias, pero en el caso de las bacterias es más complicado debido al gran tamaño y complejidad de su genoma. Ejemplo de este tipo de vacunas en medicina veterinaria es el de la enfermedad de Aujeszky o el de la rinotraqueítis infecciosa bovina, eliminando genes que codifican proteínas ligadas a la virulencia, consiguiendo cepas atenuadas de manera estable y segura. La característica de estos virus vacunales de carecer de ciertas proteínas, inducen en los animales vacunados la ausencia total de anticuerpos contra la proteína del gen eliminado. En este sentido, la utilización de este tipo de vacunas combinada con pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra el gen eliminado, permite detectar solamente aquellos animales naturalmente infectados por el virus de campo completo. La utilización de esta estrategia incrementa el nivel de éxito de los planes de control sanitario de las enfermedades.

Vacunas vivas recombinantes

Las vacunas recombinantes vivas están basadas en la utilización de un microorganismo (virus o bacteria) que actuaría como vector y que por técnicas de ingeniería genética se le adicionó uno o varios genes que codifican proteínas responsables de inducir una respuesta inmune de protección en el animal destino de la vacuna. De esta forma, este nuevo microorganismo recombinante puede utilizarse como vacuna. Ejemplo de este tipo es el caso del uso del poxvirus de canario que lleva adicionados genes que codifican dos proteínas inmunogénicas del virus del moquillo canino. El poxvirus del canario es inocuo para el perro pero gracias a los pocos ciclos replicativos de estos virus recombinante, la expresión de las proteínas del virus del moquillo protege al animal de esta enfermedad. Son vacunas que siendo vivas o replicativas son altamente seguras.

Vacunas a subunidades de proteínas recombinantes

Esta técnica se basa en la producción de una proteína o proteínas de un agente infeccioso sin necesidad del propio microorganismo, mediante técnicas de ingeniería genética se aísla el o los genes en cuestión que se incorporan a los llamados vectores de expresión que pueden ser bacterias, virus o levaduras y de esta manera estos vectores expresan una o varias proteínas del agente infeccioso, que se purifican y pueden ser utilizadas como vacuna a subunidades. Los vectores de expresión más utilizados son *E. coli*, virus de insectos llamados baculovirus y

levaduras como la *Pichia pastoris*. Actualmente, también se incorporaron las plantas como sistemas de expresión de proteínas heterólogas. La elección de uno u otro vector depende muchas veces de la calidad y tipo de proteína que se necesita como inmunógeno.

Vacunas a proteínas sintéticas

Las vacunas sintéticas se elaboran a partir de polipéptidos que copian la secuencia primaria de aminoácidos de los epítopes de un microorganismo, estrechamente relacionados con la respuesta inmune protectora. Estos péptidos se elaboran en forma sintética y la principal desventaja es su falta de inmunogenicidad; muchas veces debido a que la producción en forma sintética no respeta la estructura tridimensional de las proteínas se dificulta su reconocimiento por las estructuras del sistema inmune. Este tipo de vacunas tuvo un escaso desarrollo y sólo a nivel experimental.

Vacunas anti-idiotipo

Estas vacunas se basan en el reconocimiento de las estructuras en la reacción antígeno anticuerpo. Para producirlas, el primer paso es obtener un anticuerpo contra un determinado antígeno, denominado idiotipo, se le purifican las regiones variables de las inmunoglobulinas, que poseen la estructura inversa del epítopeinductor y se inoculan en un animal para estimular la producción de anticuerpos anti-idiotipo. Estos anticuerpos tendrán la misma estructura que el antígeno original y por tanto servirían como antígenos para inmunizar frente al primer antígeno que inició la cadena. Los anticuerpos anti-idiotipo pueden ser policlonales o monoclonales y podrían ser utilizados como vacunas, especialmente en aquellos casos en los que es muy difícil obtener las proteínas, codificar los genes correspondientes a las proteínas de interés inmunológico o cuando el agente patógeno sufre continuas mutaciones.

Vacunas a ADN

En este tipo de vacunas se utiliza directamente una porción de ADN purificado que contenga el gen de la proteína que produce la respuesta inmune. Éstas son plásmidos en los que se introduce el gen o genes del patógeno contra el que se pretende inmunizar y que codifican para las proteínas inmunogénicas responsables de inducir una respuesta inmune protectora. Cuando se inyecta el plásmido en el músculo o en la piel, las células del paciente vacunado captan ese plásmido y lo incorporan en su núcleo, permitiendo la expresión del gen foráneo y produciendo la proteína recombinante. Las propias células del cuerpo se convierten en fábricas de inmunógenos vacunales, creando los antígenos necesarios para estimular el sistema inmunitario, simulando una infección vírica natural. En medicina veterinaria hay muy pocas vacunas a ADN, algunos ejemplos actuales son la vacuna de ADNp contra el Virus del

Oeste del Nilo, la vacuna de ADNp contra el virus de la necrosis hematopoyética del salmón de criadero y la vacuna de ADNp que codifica para el melanoma canino.

Finalmente, se pueden mencionar las vacunas comestibles, se encuentran a nivel experimental, se trata de plantas a las que se les introdujo, mediante técnicas de ingeniería genética, un gen portador de la información necesaria para producir en su interior una proteína antigénica. Estas plantas, de carácter transgénico, pues se modificaron genéticamente, pueden ser cultivadas de manera natural y consumidas como vacunas comestibles por humanos y animales. Tienen la ventaja de su administración oral, que por ello da lugar a una respuesta inmunitaria mucosa. Su inconveniente es que los antígenos de la vacuna pueden sufrir una degradación en estómago e intestino antes de desencadenar la respuesta inmunitaria y en el peor de los casos tolerancia.

Referencias

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2014. Cellular and Molecular Immunology. 8ª edición. Philadelphia, USA; Elsevier Saunders.
- Day MJ. & Schultz RD. 2011. Veterinary Immunology Principles and Practice. London, UK; Manson Publishing.
- Fiordalisi MN, Lim, LCL, Kane KL, Folds JD. Active and passive immunization. En: Topley & Wilson. 1999. Microbiology and Microbial Infections. Bacterial infections, 9th edition. Philadelphia, USA. Ed. William J Hausler Jr-Max Sussman. pp 107-119.
- Gutiérrez Pabello J.A. 2010. Inmunología Verterinaria. Mexico DF; Ed. Manual Moderno.
- Hadler SC, Redd SC y Sutter RW. Immunoprophylaxis of viral diseases. En: Topley & Wilson. 1999. Microbiology and Microbial Infections. Bacterial infections, 9th edition. Philadelphia, USA. Ed. William J Hausler Jr-Max Sussman. pp 973-988.
- Hunter P. Vaccination. 1997, The Control of Animal Diseases in South Africa. London, UK; Promedia Publications.
- Roth JA. 2004. Veterinary vaccines and their importance to animal health and public health. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. 5^{ta} Edición, Tomo 1 (OIE). p 634. Cap. 1.1.7.
- Manual de Vacunas de Latinoamérica. 2005. Asociación Panamericana de Infectología. RR Donnelley Moore. pp. 1-32.
- Morrow JW. 2012. Vaccinology: principles and practice. London, UK; Ed Wiley-Blackwell.
- Orenstein W, Picazo J (eds.). Vacunas. 2009. 2^{da} Edición. Buenos Aires. pp 1-121.
- Pandey R. 2011. Veterinary Vaccines (Progress in Vaccinology). Berlín; Ed Springer.
- Pennimpede EF, Gómez CM, Stanchi NO. 2004. Introducción a la Inmunobiología. La Plata; Editorial de la Universidad de La Plata (edulp) pp 345-653.
- Sánchez-Vizcaíno JM. 2010. Curso de Introducción a la Inmunología Porcina. 3^{ra} Edición. Madrid. <http://sanidadanimal.info/cursos/inmunologia3/index.htm>
- Tizard IR. 2009. Introducción a la Inmunología Veterinaria. 8^{va} Edición. Philadelphia, USA; Ed Elsevier Saunders.

CAPÍTULO 4

Bacillus anthracis

Alejandra E. Larsen y Fabiana A. Moredo

Bacillus anthracis es el agente etiológico del ántrax o carbunco bacteriano, enfermedad que afecta principalmente animales herbívoros especialmente rumiantes, aunque los carnívoros y omnívoros pueden contraerla por ingestión de animales enfermos. Es una zoonosis importante y ocupacional, el mayor riesgo lo sufre el personal de esquila, médicos veterinarios y trabajadores del campo); en los últimos años se conoció su utilización como arma biológica entre otros factores por su alta toxicidad. A pesar de los programas de vigilancia y control, la enfermedad continúa siendo endémica en muchas regiones del mundo y su prevención en humanos se logra controlándola en los animales. Es de declaración obligatoria y bajo medidas de control y vacunación puede ser controlada satisfactoriamente. En nuestro país es endémica y en algunas provincias la vacunación está implementada por ley.

Taxonomía y características generales

Bacillus anthracis es un bacilo grampositivo que se encuentra en una amplia variedad de ambientes y en numerosos hospedadores mamíferos en todo el mundo. Pertenece al grupo *Bacillus cereus* que engloba también a las especies esporuladoras *B. cereus* sensu stricto, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* y *B. weihenstephanensis* y a las especies propuestas *B. cytotoxicus* y *B. gaemokensis*. *B. anthracis* comparte gran similitud fisiológica y de estructura genética con *B. cereus*, un microorganismo ubicuo y patógeno humano oportunista y con *B. thuringiensis*, patógeno de insectos utilizado como biopesticida del cual se describieron algunas cepas que pueden ser patógenas para humanos. Sin embargo, estas especies poseen diferente patogenicidad en términos de virulencia y rango de hospedadores. Dada la gran similitud entre los genomas de *B. anthracis*, *B. cereus* y *B. thuringiensis*, existe actualmente un importante debate sobre la clasificación sistemática de los miembros del grupo *B. cereus* e incluso se planteó si los tres taxa deberían ser considerados como una única

especie bacteriana o si se debería mantener el estatus de especies separadas a causa de sus características patogénicas distintivas.

Los esporos de *B. anthracis* se encuentra en el suelo. Son estables y resistentes al estrés ambiental. Luego del ingreso al hospedador por contacto, ingestión o inhalación, germinan transformándose en formas vegetativas que pueden replicarse exponencialmente en casi todos los tejidos. La forma cutánea de infección es relativamente benigna y permanece localizada, es fácilmente identificable y puede ser tratada efectivamente con antibióticos, mientras que las infecciones por inhalación e ingestión de esporos son extremadamente severas, fulminantes y difíciles de diagnosticar. Una vez muerto el hospedador, el contacto de los tejidos infectados con el oxígeno del aire induce la esporulación de la bacteria, que de ese modo puede sobrevivir en reposo en el suelo por varias décadas hasta que encuentra condiciones ambientales favorables para la germinación. El ántrax es principalmente una enfermedad de los herbívoros (vacas, cabras y ovejas) pero todos los mamíferos son susceptibles. En humanos, el ántrax ocurre usualmente por exposición cutánea a animales o productos de animales infectados (cuero, carne, lana, huesos) y aún en la actualidad el hombre es infectado ocasionalmente por inhalación o ingestión de esporas de *B. anthracis*.

Factores de virulencia

La patogenicidad de *B. anthracis* se debe a sus principales factores de virulencia que son la cápsula de poliglutamato y las toxinas que produce, compuestas por tres proteínas que actúan combinadas de a dos. Estas proteínas son el antígeno protector, conocido por su uso en la elaboración de vacunas, el factor edema y el factor letal. Los genes que codifican las toxinas se encuentran en el plásmido pXO1 y el operón donde se encuentran los genes que codifican la cápsula, en el plásmido pXO2. Sólo recientemente comenzó a revelarse la importancia de otros factores de virulencia, como por ejemplo los sideróforos.

La secuencia genómica del *B. anthracis* indica que es una bacteria que evolucionó para adaptarse a sus hospedadores. El genoma codifica genes para factores de virulencia putativos como hemolisina, proteasas, fosfolipasa y proteínas relacionadas con el secuestro de hierro (sideróforos) que también se encuentran codificados en los plásmidos pXO1 y pXO2 y son esenciales para la virulencia del *B. anthracis*.

El plásmido denominado pXO1 está constituido por 217 genes entre los que se incluyen *pagA* que codifican al antígeno protector (PA), *cya* para las toxinas o factor edemático/edematógeno (EF) y *lef* para el factor letal (FL), todos contenidos en un sector denominado isla de patogenicidad. También se encuentra el operón de germinación *gerX* y reguladores de transcripción que regulan la virulencia. El pXO2 contiene 113 genes incluyendo el operón para la biosíntesis de la cápsula y sus factores de transcripción.

Cápsula

Bacillus anthracis, al igual que muchas otras bacterias patógenas, forma como estructura accesoria más externa, la cápsula que está implicada en su primer contacto con las células hospedadoras. En general, las cápsulas bacterianas están compuestas por polisacáridos. Por el contrario, la cápsula de *B. anthracis* es peptídica y está constituida por un homopolímero lineal de D-glutamato anclada al péptidoglicano, con inmunogenicidad extremadamente débil, lo que le permite a la bacteria evadir la respuesta inmune y diseminarse en el hospedador. El control de la síntesis de la cápsula ocurre a nivel de la transcripción e involucra la regulación del operón biosintético a través de la concentración de CO₂ /bicarbonato y de tres genes reguladores: *atxA*, *acpA* y *acpB*, el primero localizado en pXO1 y los dos últimos codificados por pXO2. Para la síntesis del poliglutamato, *B. anthracis* utiliza como sustratos glutamato y ATP. La reacción puede ser dividida en dos pasos: la producción del polímero y su transporte a través de la membrana celular. El anclaje del poliglutamato a la superficie bacteriana es importante para la virulencia. Comienza a sintetizarse inmediatamente después de la germinación, emerge como ampollas que van cubriendo al bacilo hasta que confluyen para quedar conformada como una capa continua encapsulando a la bacteria antes de emerger. Su función es proteger al bacilo dentro del fagolisosoma. Su carga aniónica sería la responsable del efecto antifagocítico y refractario a opsoninas como anticuerpos y el fragmento C3b del complemento.

Toxinas

Aunque la cápsula es un factor de virulencia importante para el establecimiento de la enfermedad, los signos asociados con el ántrax son el resultado de la producción de toxinas durante el desarrollo bacteriano. El efecto combinado de toxemia y bacteriemia conduce a la muerte del hospedador infectado y, aunque los antibióticos pueden liberarlo del patógeno, no pueden protegerlo de los efectos de las toxinas.

Como se mencionó, las toxinas consisten en un complejo de tres proteínas: el antígeno protector (PA, *protective antigen*), llamado así por su habilidad para estimular una respuesta inmune protectora en el hospedador, el factor letal (LF, *lethal factor*) y el factor edema (EF, *edemafactor*). Ninguna de estas proteínas son tóxicas de forma individual, pero sí lo son, combinadas de a pares para formar la toxina letal y la toxina edemática. La combinación de PA y LF forma la toxina letal que causa la muerte en animales de experimentación y la lisis de ciertas líneas celulares eucarióticas. La toxina edemática, constituida por PA y EF, induce un incremento en los niveles de AMPc (AMP cíclico) intracelular generando edema en los tejidos. Similar a lo que ocurre con la cápsula, en condiciones de laboratorio, la producción de estas toxinas es inducida por la temperatura (37 °C) y la presencia de CO₂ y bicarbonato, condiciones que reflejan el medio interno normal en el hospedador mamífero.

Las toxinas del ántrax pertenecen al modelo binario A-B en el cual el componente B, en este caso PA, es el dominio que se une al receptor de la célula blanco y envía al componente A, que posee actividad enzimática, a través de la membrana para que acceda a las proteínas blanco (Figura 1). PA actúa como una entidad común de unión al receptor e interactúa tanto con EF como con LF para mediar sus entradas en las células blanco.

El PA se une al receptor de la célula blanco y es el responsable del transporte de EF y LF dentro de la célula, en una serie compleja de eventos. En un primer paso (Figura 1) el PA, como proteína madura de 83 kDa (PA83), se une específicamente por lo menos a dos receptores de superficie celular distintos y es escindido por una proteasa celular, quedando su región carboxilo-terminal de 63 kDa (PA63) unida a la superficie de la célula blanco. PA63 se oligomeriza espontáneamente formando el heptámero PA7mer, al que se unen EF y/o LF, ya que al separarse el fragmento amino-terminal de 20 kDa (PA20), queda expuesto en PA63 un sitio al cual se unen competitivamente EF y LF con alta afinidad. El complejo proteico formado ingresa a la célula por endocitosis mediada por receptor. Finalmente, el ambiente ácido del endosoma induce cambios conformacionales en el heptámero que conducen a su inserción en la membrana endosomal. La actividad formadora de canales de PA63 produce la traslocación de EF y LF dentro del citosol de la célula blanco, donde ejercen sus efectos tóxicos.

Las toxinas de *B. anthracis* interfieren con las vías de señalización intracelular de numerosas células blanco entre ellas las del sistema inmune innato y adaptativo.

Péptido antígeno protector (AP)

El AP se estableció como el principal inmunógeno con función protectora contra el ántrax. Es un antígeno timo-dependiente y en estudios de vacunas de aplicación en humanos se determinó que la inmunización con PA induce una fuerte respuesta a IgG, sobretodo IgG1, que promueve una mejor respuesta contra las otras dos toxinas.

Toxina edematógena o Factor Edematógeno (EF)

El factor edema como proteína madura tiene 767 aminoácidos y un peso molecular de 89 kDa. Es una adenilato ciclasa que causa edema al incrementar fuertemente los niveles intracelulares de AMPc a partir de ATP, luego de su entrada en la célula hospedadora. El AMPc intracelular es un mensajero secundario que regula muchas respuestas celulares, entre ellas la producción de citoquinas que modulan la formación de edema. La actividad enzimática de EF depende de iones de calcio y magnesio y de calmodulina². La región amino-terminal del EF (Figura 5A) contiene los aminoácidos responsables de la unión a PA63 incluyendo siete aminoácidos que se encuentran presentes también en el LF. El EF, a diferencia del LF que se

²La calmodulina está presente en todas las células eucariotas, en las que modula muchos procesos intracelulares incluyendo la transducción de señales y la transcripción de genes. Esta proteína transduce las señales intracelulares de calcio a través de dos dominios globulares conectados por una hélice central flexible. El calcio es necesario para formar el complejo adenilato ciclasa/calmodulina, mientras que el magnesio forma un complejo con el sustrato ATP. Es importante decir que las adenilato ciclasas que requieren calmodulina son típicas de los eucariotas, mientras que sólo unas pocas adenilato ciclasas procariotas, como la toxina CyaA de *Bordetella pertussis*, la ExoY de *Pseudomonas aeruginosa* y la adenilato ciclasa de *Yersinia pestis*, además del EF de *B. anthracis*, requieren calmodulina.

dispersa en el citosol, permanece asociado a la membrana del endosoma tardío luego de su translocación (Figura 3), con sus dominios catalíticos expuestos hacia el citoplasma.

La conversión de AMP a AMPc por parte del EF contribuye con la patogénesis de la enfermedad al inhibir la fagocitosis de las bacterias por parte de células fagocíticas infectadas, inhibiendo la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias. Esta acción favorece a la bacteria inhibiendo la respuesta inmune innata. También disminuye la circulación linfocitaria y la respuesta oxidativa al no permitir la liberación del anión superóxido.

Toxina letal o Factor Letal (LF)

El factor letal es una metaloproteasa dependiente de zinc altamente específica, similar a las toxinas de *Clostridium botulinum* y *Clostridium tetani*. Posee 776 aminoácidos como proteína madura y un peso molecular de 90 kDa. El LF corta la región amino-terminal de una familia de quinasas (MAPKK, *mitogen-activated protein kinase kinases*), que modulan la expresión génica a través de la fosforilación de proteínas, inactivando de esta manera varios mecanismos de señalización celulares, que juegan importantes roles en numerosas funciones que van desde la proliferación celular y regulación del ciclo celular hasta la modulación de la respuesta inmunológica. Las MAPKK son el único sustrato conocido del LF.

Uno de los primeros efectos del LF en ser detallado fue la rápida inducción de la muerte de los macrófagos en algunas cepas de ratones. Se describió el mecanismo de muerte como el resultado de la unión del LF con componentes del inflammasoma y la consiguiente activación de la Pro caspasa1 desencadenando un tipo de muerte programada, en contexto de infección, denominada piroptosis. Otras células susceptibles de ser inducidas a la muerte son las dendríticas, los neutrófilos y algunos tipos de células endoteliales y epiteliales. La toxina letal inhibe una gran variedad de funciones celulares relacionadas con la respuesta inmune. El clivaje de MAPKKs disminuye la síntesis de citoquinas como FNT- α e INF tipo I y II, la producción de óxido nítrico y superóxido por los neutrófilos, bloquea la diferenciación de monocitos en macrófagos, disminuye la respuesta quimiotáctica de los polimorfonucleares inhibiendo el ensamblado de los filamentos de actina. También induce apoptosis en PMN, macrófagos y células dendríticas y en células como epitelio pulmonar y células del endotelio microvascular.

Interrumpe el reconocimiento por parte de los PRR de señal como TLR2 y TLR4. Inhibe la proliferación de LTB.

Los eventos inducidos por ambas toxinas descritos hasta aquí desencadenan un deterioro del estado hemodinámico que finaliza en un shock cardiovascular.

De esta manera, ambas toxinas suprimen la respuesta inmunológica innata del hospedador contribuyendo a la diseminación de *B. anthracis* y a la progresión de la enfermedad.

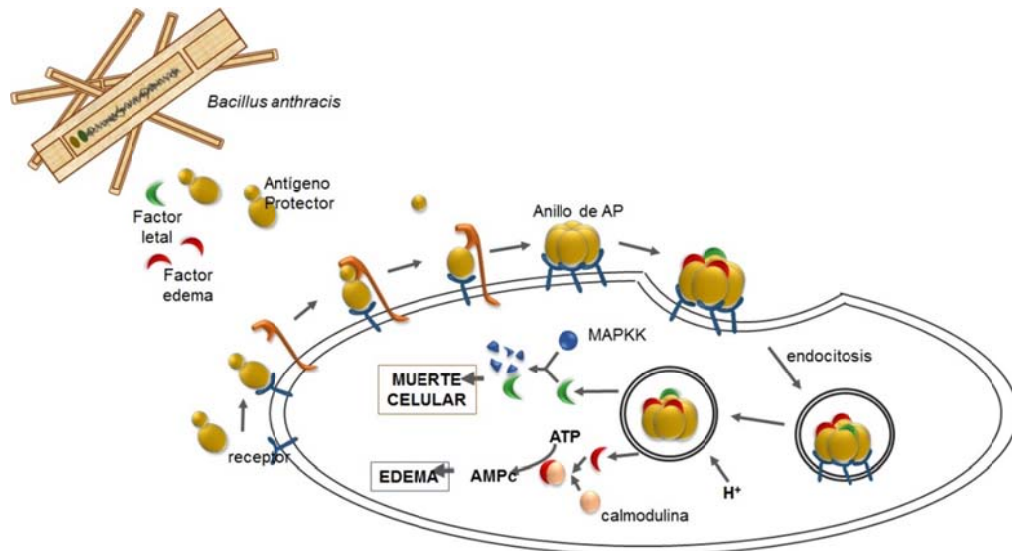


Figura 1. Mecanismo de acción de las toxinas de *B. anthracis*.

Proteasas intra y extracelulares inespecíficas

Sideróforos: bacilibactina y petrobactina

Los sideróforos son moléculas quelantes de Fe(III) que poseen una afinidad extremadamente alta por éste. Son sintetizados comúnmente por los patógenos bacterianos para la adquisición de hierro en respuesta a su escasez en el ambiente normal de los mamíferos, ya que el hierro necesario para establecer una infección exitosa se encuentra unido a diversas moléculas del hospedador y su disponibilidad está altamente regulada por mecanismos homeostáticos. El fuerte crecimiento de *B. anthracis* observado durante una infección, desde la captura de las esporas por los fagocitos hasta la liberación de los bacilos vegetativos desde los nódulos linfáticos con la subsiguiente infección sanguínea, sugiere la hipótesis que la biosíntesis de sideróforos es un requerimiento adicional para la virulencia. *B. anthracis* produce dos sideróforos distintos, la bacilibactina y la petrobactina, llamadas inicialmente antrabactina y antraquelina respectivamente, que le suministran el hierro necesario durante los estadios de rápido crecimiento. A pesar de la gran eficiencia de la bacilibactina para quelar hierro, la petrobactina sería el único sideróforo necesario para asegurar la virulencia y el crecimiento de *B. anthracis* dentro del hospedador, ya que la pérdida de la bacilibactina no altera la virulencia en modelos animales. La petrobactina como factor de virulencia evade a la proteína siderocalina, una proteína que forma parte del sistema inmune innato del hospedador. La petrobactina libre o unida al hierro férrico evade sigilosamente al sistema inmune del hospedador. En medios de cultivo con bajo contenido de hierro, la petrobactina y la bacilibactina son producidas temporalmente durante la germinación de la espora y el crecimiento de *B. anthracis*. La petrobactina se secreta primero mientras que la liberación de la bacilibactina comienza varias horas más tarde, lo que sugiere que esta última puede cumplir un

rol en los estadios tardíos de la infección. La síntesis de los sideróforos está regulada por el nivel de hierro, la temperatura y la presencia de CO₂ /bicarbonato. En el genoma de *B. anthracis* hay al menos dos grupos de genes que codifican la biosíntesis independiente de los dos sideróforos, y otros genes que son homólogos a los presentes en otras bacterias y que están relacionados con el transporte y almacenamiento de hierro y a proteínas reguladoras.

Anthrolisina O

B. anthracis en su forma vegetativa secreta Anthrolisina O (ALO) una citolisina dependiente del colesterol. Es reconocida por el TLR4 y estimula la producción de ARNm de citoquinas pro-inflamatorias FNT- α , IL1, IL6, y se cree que su presencia es necesaria para inducir la apoptosis de los macrófagos.

Fosfolipasa C

Bacillus anthracis presenta 2 genes que codifican para dos proteínas putativas de fosfolipasa C. Estas proteínas en otros bacilos se unen fuertemente a la membrana celular y alteran la función de PRR de endocitosis como el CD14/LPS y el receptor para Fc de IgG (Fc γ -RIII). *In vitro* se demostró que también induce la alteración de PRR de señal como TLR 2-3-4 y 9, disminuyendo la expresión de moléculas de co-estímulo como CD80/86 y de moléculas del CMH, inhibe la producción de FNT- α y la vía de señalización MAPK. Estos eventos alteran indirectamente la activación de los LT

Capa S en *Bacillus anthracis*

Además de los principales factores de virulencia ya analizados, actualmente se considera también importante para la virulencia la presencia en *B. anthracis* de una capa S (*S-layer*, *surface layer*) rodeando la pared de las células vegetativas. La capa S es una capa proteica de apariencia cristalina y con variadas simetrías, presente sobre la superficie de muchos géneros bacterianos. La capa S podría ser un factor de virulencia en las bacterias patógenas actuando como un elemento de protección frente a ciertos mecanismos de defensa del hospedador, facilitando la unión de la bacteria a moléculas presentes en las células infectadas o aumentando su capacidad para asociarse con los macrófagos. Si bien en *B. anthracis* la presencia de la capa S no influye en la dosis letal 50 % en los animales de experimentación, tendría un efecto acumulativo junto con la cápsula, incrementando la resistencia del patógeno frente a las defensas del hospedador mediadas por el complemento. Los componentes más abundantes de la capa S de *B. anthracis* son dos proteínas, Sap (*surface-array protein*) y EA1 (*extractable antigen 1*), sintetizadas secuencialmente de una manera dependiente de la fase de crecimiento. En medio rico, durante la fase exponencial del crecimiento, la capa S de *B. anthracis* está formada por la proteína Sap y, cuando las células entran en la fase estacionaria,

esta capa es reemplazada por una capa S constituida por EA1. La proteína EA1 es un importante antígeno de superficie. Sap y EA1 están codificadas por los genes cromosomales *sap* y *eagy* regulados por los productos de los genes *atxA* y *pagR*, codificados por el plásmido pXO1, indicando que genes de un plásmido pueden regular genes cromosomales. Recientemente se describió la proteína BslA (*B. anthracis* S-layer protein A), una adhesina de la capa S, que media la adherencia de la forma vegetativa de *B. anthracis* a la célula hospedadora y que se propone como factor de virulencia para el ántrax. El gen *bslA*, originalmente denominado pXO1-90, se encuentra dentro de una isla de patogenicidad en el plásmido pXO1.

Lipoproteína MntA

Recientemente se propuso que la lipoproteína de membrana MntA sería un nuevo factor de virulencia esencial para el desarrollo del ántrax. Está codificada en el cromosoma y forma parte de un sistema ABC de captación de manganeso. La delección del gen *mntA* provoca defectos en el crecimiento de la bacteria compensado por la adición de Mn²⁺, sensibilidad al estrés oxidativo y una severa atenuación en la dosis letal 50 en cobayos. Posteriormente se observó que MntA es un fuerte antígeno, aunque a diferencia de PA no induce protección.

Patogenia

El nombre ántrax (ἄνθραξ) viene de la palabra griega *carbón*, debido a las úlceras con centros oscuros que se desarrollan en la piel de las personas afectadas. La bacteria produce toxinas sumamente potentes que son responsables de los efectos debilitantes y causan una alta tasa de mortalidad. Actualmente aparecen casos en zonas endémicas que sufrieron algún cambio (inundaciones, sequías) que alteran el ecosistema, disminuyen la condición física de los animales y favorecen la exposición a las esporas que pueden ser ingeridas por los animales susceptibles sobretodo rumiantes.

La fuente de infección son los fluidos de los animales muertos que contienen millones de formas vegetativas del bacilo que son volcados al medio ambiente. En contacto con el oxígeno, muchas de estas bacterias mueren pero algunas se transforman en esporas, que son sumamente resistentes y sobreviven durante décadas en el suelo, en la lana o el pelo de los animales infectados. La esporulación se completa a las 48 horas y la dosis mínima infectante para el ganado está estipulada en 5×10^8 esporas. Al ingresar en un animal por ingestión o inhalación o a través de heridas en la piel (esta última la puerta de entrada más común en el hombre), se multiplican en un gran número de bacterias vegetativas; dentro de los macrófagos son diseminadas hacia los órganos linfáticos secundarios donde se siguen multiplicando. Como resultado, un flujo continuo de bacterias salen por los vasos eferentes alcanzando el bazo y otros tejidos linfoides donde continúa la multiplicación. La falla del sistema inmune innato para contener la infección resulta en una bacteriemia masiva y toxemia, causando enfermedad aguda o hiperaguda que lleva a la muerte del animal con el consiguiente derramamiento de los

bacilos al medio ambiente y así se completa el ciclo. Se la considera una enfermedad estacional, donde los casos de carbunco aumentan después de las épocas de lluvia, generando condiciones en el suelo que pueden favorecer la multiplicación de la bacteria aumentando la carga de esporos en el ambiente. Los mecanismos biológicos, físicos y químicos que desencadenan los diferentes signos y la muerte de animal infectado con el *B. anthracis* se describen en relación a los factores de patogenicidad y su relación con el sistema inmune.

Respuesta Inmune

A las cuatro horas pos-infección la respuesta innata en el punto de entrada está casi exclusivamente representada por la presencia de polimorfonucleares neutrófilos. A las 24 horas se observan macrófagos, ambos fagocitos responden a factores quimiotáticos de la bacteria.

Se determinó que los TLR involucrados en el reconocimiento de los componentes de la pared celular del bacilo son TLR2/TLR6. PA es reconocido por estos TLR solo cuando no está en combinación con los factores letal o edematógeno.

La cascada de señalización es un punto crítico para la inducción de la expresión de genes de crucial importancia en la defensa del hospedador. La toxina citotóxica del ántrax una vez translocadas al citoplasma cliva enzimas relacionadas con la vía de señalización responsables de fenómenos biológicos como fagocitosis, estallido respiratorio, secreción de citoquinas y quimioquinas.

Colaborando con la inhibición de la respuesta inmune, la cápsula inhibe la unión del fragmento C3 del complemento, tanto de la vía alterna como de la clásica disminuyendo la eficacia de este efector.

El bacilo necesita entrar a los macrófagos y células dendríticas para poder multiplicarse eficientemente en un ambiente adecuado. Cuando la puerta de entrada es la piel, los esporos pasan a la forma vegetativa y aparecen en forma extracelular como intracelular en los macrófagos residentes, desde donde invade el tejido circundante y se disemina en forma intravascular en animales susceptibles. En cambio, cuando las esporas son inhaladas necesitan atravesar la barrera del epitelio alveolar, escapando de la alta tensión de oxígeno, penetra en los macrófagos alveolares que migran al órgano linfático regional donde las esporas germinan y a partir de allí se disemina a todo el cuerpo por bacteriemia.

El filamento tipo pelo proyectado desde el exosporium de los esporas de *B. anthracis* estaría relacionado en la interacción con los fagocitos evitando la adhesión con otras células no fagocíticas.

Los mecanismos que utilizan los fagocitos para eliminar a los patógenos endocitados en el compartimiento del fagolisosoma son mecanismos microbicidas dependientes e independientes del oxígeno. Estos últimos están representados por enzimas proteolíticas contenidas en los lisosomas, como elastasas, caspasas, catepsinas, hidrolasas entre otras. Los mecanismos dependientes del oxígeno están formados por una secuencia de reacciones enzimáticas que desembocan en la síntesis de intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno. En la entidad

celular conocida como macrófago activado, diferentes enzimas oxidasas originan este mecanismo biocida. La óxido nítrico oxidasa necesita un co-factor NADPH y así ensamblada su sustrato es un aminoácido, la L-arginina y, en presencia de oxígeno, el producto que se genera es el óxido nítrico. Otras oxidasas como la mieloperoxidasa también dependiente de NADPH catalizan la formación de anión superóxido. Aunque el óxido nítrico no es muy reactivo puede reaccionar con el anión superóxido y generar oxidantes muy reactivos y tóxicos para las bacterias. Otra enzima que colabora con la producción de moléculas reactivas de oxígeno es la superóxido dismutasa que genera agua oxigenada y oxígeno libre. También se generan radicales oxidrilo, hipocloritos.

Para competir con toda esta batería de elementos biocidas el *B. anthracis* desarrolló a lo largo de la evolución enzimas como arginasa, superóxido dismutasa y óxido nítrico sintetasa. Las dos primeras están ubicadas en el exosporium del esporo y tienen como función disminuir los sustratos para las mismas enzimas celulares, permitiendo la supervivencia del esporo y su forma vegetativa en el fagolisosoma donde replican y comienza la síntesis de toxinas y la producción de la cápsula y factores de virulencia que contribuyen con la muerte del macrófago. De esta manera la toxina EF inhibe la fagocitosis y el metabolismo oxidativo en los fagocitos.

La toxina letal (PA + LF) estimula la producción de TNF- α e interleuquina (IL) -1b, que promueven hemorragia y destrucción celular. Finalmente esta toxina induce la muerte del macrófago evitando la progresión de la respuesta inmune.

Con respecto a las células dendríticas, la toxina letal induce la maduración incompleta de la célula dendrítica que por un lado le permite dirigirse a los órganos linfáticos secundarios como su estrategia de diseminación, pero por otro no permite la normal expresión de las proteínas involucradas en la segunda señal de activación de los LT inmaduros. Induce una defectuosa desregulación de los genes que codifican para las moléculas de co-estimulo por ej. CD40, CD80 y CD86. Contrariamente a lo comentado, la toxina letal induce la expresión de CMH tipo II, de esta manera el estímulo de activación incompleto de un linfocito virgen lo induce a anergia evitando la instauración de la respuesta adaptativa. Estos linfocitos anérgicos no se diferencian en LT CD4 colaboradores foliculares evitando la respuesta humoral adaptativa y colaborando con la multiplicación del patógeno.

El sistema del interferón es otra herramienta con la que cuenta el sistema inmune innato (INF tipo I y II) y adaptativo (INF tipo II) para contrarrestar las infecciones por microorganismos de vida intracelular, ya sean virus, bacterias, hongos o parásitos. Son mensajeros celulares que modulan la respuesta innata, que es el blanco de los factores de patogenicidad del *B. anthracis*. La exposición de macrófagos infectados con estas bacterias, a INF tipo I y II mejoran significativamente la viabilidad celular del fagocito, reduce el número de formas vegetativas del *B. anthracis* y aumenta la supervivencia a la intoxicación por LF. Particularmente el INF tipo II secretado por las células NK y LT activan al macrófago, modulan la quimiotaxis y regulan positivamente la expresión de moléculas involucradas en la presentación de antígeno, como por ejemplo moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad.

Las células dendríticas inmaduras mediante los procesos de fagocitosis y macropinocitosis que realizan al extender sus dendritas por entre el epitelio alveolo-pulmonar, internalizan esporas de *B. anthracis* que ingresan por vía aerógena. Este acto las transforma en células dendríticas maduras que migran hacia los órganos linfáticos secundarios regionales ya que adquieren receptores de quimiocinas como CCR7. Las células dendríticas son las células que hacen el trabajo de intermediarios celulares del sistema inmune ya que toman la información en el foco infeccioso y la traducen, en su viaje a la zona T de los órganos linfáticos secundarios, en péptidos antigénicos capaces de ser reconocidos por los LT y así activar la respuesta adaptativa en su totalidad. En horas, como resultado de la interrupción de las vías de señalización por las toxinas del *B. anthracis* se inhibe la secreción de las citoquinas TNF- α , IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12. La toxina LF también inhibe la regulación de las moléculas de co-estimulo CD40, CD80 y CD86, esenciales para la activación de los LT vírgenes por lo tanto no hay diferenciación en LT CD4 colaboradores Th1 y Th2 como las demás subpoblaciones y, aquellas que alcanzan la diferenciación, no maduran en células de memoria. La toxina LF mata a las células dendríticas induciendo una apoptosis lenta, dentro de las 72 horas de iniciada la intoxicación de la célula.

Se demostró *in vitro* que *B. anthracis* es capaz de infectar células no fagocíticas como fibroblastos y células epiteliales, que al no tener los medios bactericidas de los fagocitos permiten más fácilmente la multiplicación y la liberación de más bacterias al medio.

Las toxinas EF y LF interrumpen las vías de señalización intracelular tanto en células de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa, sin embargo ninguna toxina induce apoptosis ni lisis de las células de la inmunidad adaptativa. En experiencias de laboratorio se demostró que ambas toxinas en sinergia inhiben la activación y proliferación de los LT CD4 colaboradores, e inhiben la secreción de citoquinas incluyendo IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α , IFN- γ y factor de crecimiento de colonias de granulocitos y macrófagos.

Prevención y Control

Antes de la década del 30, previo a la vacuna de Sterne y de la época antibiótica, esta enfermedad fue causa de mortalidad descontrolada en el ganado y animales silvestres en todo el mundo. El control basa en 3 pilares: 1-vacunación sistematizada y obligatoria, que hasta el momento se implementa en combinación con la vacunación anti-aftosa en algunas provincias del país (Buenos Aires y Santa Fe), 2-eliminación de cadáveres en forma adecuada, 3-evaluación de indicadores epidemiológicos que monitoreen la evolución de la enfermedad carbunclosa. En esta última importa mucho la denuncia obligatoria y diagnóstico directo para corroborar la causa del brote.

En Argentina, la explotación ganadera está concentrada en 7 provincias del centro, donde están distribuidas la mayoría de las más de 40 millones de cabeza de ganado que conviven con 2 millones de habitantes rurales lo que implica un alto riesgo de transmisión del ántrax.

El relevamiento serológico no está indicado ya que los animales vacunados presentan anticuerpos y los animales infectados mueren antes de llegar a desarrollar una respuesta adaptativa.

En humanos

Se puede proteger a los humanos evitando la enfermedad en los animales. La supervisión veterinaria de la producción y de la faena de animales también ayuda a prevenir el contacto con el ganado bovino o productos de origen animal infectados. Se pueden aplicar restricciones en la comercialización de ciertos productos animales que proceden de países donde el ántrax es frecuente y no está controlado. La mejora en la calidad de los procesos industriales disminuyó los riesgos para aquellas personas que están expuestas a la manipulación de cueros, lana, harina de hueso y otros productos animales. En los laboratorios se deben poner en práctica buenas medidas de bioseguridad, incluyendo el uso de cabinas de seguridad biológica; los veterinarios deben utilizar ropa y equipos de protección personal cuando examinan animales enfermos. También se debe evitar realizar necropsias en los casos que se sospeche, la presencia de la enfermedad.

En animales

En zonas endémicas, las vacunas pueden prevenir el ántrax en el ganado; vacunando anualmente antes de que comience la estación en la que suelen ocurrir los brotes.

La vacuna de uso veterinario fue desarrollada por Sterne en 1937. Este médico veterinario y bacteriólogo obtuvo una variante rugosa de *B. anthracis* virulenta en cultivos sólidos, con suero y en atmósfera con elevada concentración en CO₂, denominada 34F2. Es una vacuna convencional, homologa, viva y esporulada, acapsulada y acapsulógena debido a la pérdida plásmido pX02. Es la cepa más utilizada en todo el mundo para producción de vacunas contra el carbunco en animales y es la que se utiliza en Argentina.

El ántrax es una enfermedad de denuncia obligatoria; para prevenir la propagación durante los brotes deben considerarse la cuarentena, la correcta eliminación de los cadáveres y la desinfección. Los animales enfermos deben aislarse. Para evitar la esporulación, no se deben abrir los cadáveres. También debe evitarse la presencia de animales carroñeros. Existen reglamentaciones que determinan la metodología para eliminar cadáveres; sin embargo se considera que la incineración o la calcinación es el método más eficaz para la eliminación de los cadáveres, estiércol, camas y otros materiales contaminados. Los establos, corrales y el equipamiento se deben limpiar y desinfectar. Una vez que el suelo se contaminó con esporos es muy difícil de desinfectar; sin embargo existen procedimientos como la remoción de la tierra y/o el tratamiento con formaldehído que se pueden utilizar en ciertos casos. La utilización de repelente para insectos puede evitar que las moscas propaguen el microorganismo. Si una mascota estuvo expuesta al ántrax, se debe higienizar su pelaje por medio de baños sucesivos.

Notificación a las autoridades

El carbundo es considerado una enfermedad de declaración obligatoria, Tanto los veterinarios como el laboratorio que detecten un caso deben seguir las pautas nacionales y/o locales de notificación así como la utilización de las pruebas de diagnóstico correspondientes.

Referencias

- Brittingham KC, Ruthel G, Panchal RG, Fuller CL, Ribot WJ, Hoover TA, et al. Dendritic cells endocytose *Bacillus anthracis* spores: implications for anthrax pathogenesis . J Immunol. 2005;174:5545-52.
- De la Sota P. Manual de Procedimientos Carbunco. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). 2004. Buenos Aires.
- Drysdale M, Olson G, Koehler TM, Lipscomb MF, Lyons CR. Murine innate immune response to virulent toxigenic and nontoxigenic *Bacillus anthracis* strains. Infect Immun. 2007;75:1757-64.
- Fukao T. Lethal toxin Immune system paralysis by anthrax lethal toxin: the roles of innate and adaptive immunity. Volume 4, Issue 3, March 2004, Pages 166-70. doi.org/10.1016/S1473-3099(04)00940-5.
- Liu S, Miller RS, Crown D, Moayeri M, Sastalla I, Okugawa S, Leppla S. Anthrax toxin targeting of myeloid cells through the CMG2 receptor is essential for establishment of *Bacillus anthracis* infections in mice. Cell Host and Microbe. 2010. DOI:10.1016/j.chom.2010.10.004
- OIE. 2012. Enfermedades de varias especies de la lista B. CARBUNCO. CAPÍTULO 2.2.1. http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.2.01_Carbunco.pdf
- Paván ME, Pettinari MJ, Cairó F, Paván EE, Cataldi AA. *Bacillus anthracis*: una mirada molecular a un patógeno célebre. Rev Arg Microbiol. 2011;43: 294-310.
- Powell JD, Hutchison JR, Hess BM, Straub TM. *Bacillus anthracis* spores germinate extracellularly at air-liquid interface in an in vitro lung model under serum-free conditions. J Appl Microbiol. 2015;119:711-23.
- Programa de control del carbunco bovino. Ministerio de agroindustria. 2016. http://www.maa.gba.gov.ar/2010/SubPED/Ganaderia/archivos/Manual_Carbunco_2016_oct.pdf
- Spickler AR, Roth JA, Galyon J, Lofstedt J, Lenardón MV. Enfermedades Emergentes y Exóticas de los Animales. The Center for Food Security & Public Health. Primera Edición. 2010. Iowa State University, Ames Iowa, USA.
- Shetron-Rama LM, Herring-Palmer AC, Huffnagle GB, Hanna P. Transport of *Bacillus anthracis* from the lungs to the draining lymph nodes is a rapid process facilitated by CD11c+ cells. Microb Pathog. 2010;49(1-2):38-46. doi: 10.1016/j.micpath.2010.02.004.
- Syed Raza A, Timmer AM, Bilgrami S, Park EJ, Eckmann L, Nizet V, Karin M. Anthrax Toxin Induces Macrophage Death by p38 MAPK Inhibition but Leads to Inflammasome Activation via ATP Leakage. Immunity, 16 June 2011 DOI:10.1016/j.immuni.2011.04.015

Stewart GC. The Exosporium Layer of Bacterial Spores: a Connection to the Environment and the Infected Host. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2015; 79(4):437-57. doi: 10.1128/MMBR.00050-15.

Triantafilou M, Uddin A, Maher S, Charalambous N, Hamm T, Alsumaiti A, Triantafilou K. Anthrax toxin evades Toll-like receptor recognition, whereas its cell wall components trigger activation via TLR2/6 heterodimers. *Cel Microbiol.* 2007;9(12):2880-92. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01003.

Zakowska D, Bartoszcze M, Niemcewicz M, Bielawska-Drózd A, Kocik J. New aspects of the infection mechanisms of *Bacillus anthracis*. *Ann Agric Environ Med.* 2012;19(4):613-8.

CAPÍTULO 5

Brucelas

Fabiana A. Moredo y Alejandra E. Larsen

Las bacterias pertenecientes al género *Brucella*, son agente etiológico de la brucelosis, zoonosis que afecta a mamíferos domésticos y salvajes. La infección se transmite directamente de animales a humanos por contacto directo con fluidos animales contaminados (fetos abortados, placenta, etc.), por inhalación de aerosoles o indirectamente a través de la ingestión de productos lácteos no pasteurizados (Enfermedad Transmitida por Alimentos). A pesar de los programas de vigilancia y erradicación recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), la enfermedad sigue siendo endémica en muchas regiones del mundo. La prevención de la infección en humanos se logra controlando la enfermedad en los animales (vacunación, decomiso) y mediante la pasteurización de los productos lácteos.

Brucella es un patógeno intracelular facultativo que tiene la capacidad de sobrevivir y multiplicarse en los fagocitos. Causa aborto y disminución de la fertilidad en el ganado vacuno y fiebre ondulante en el hombre. *Brucella* spp., especialmente *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* representan un importante problema para la salud pública. En Argentina, las infecciones por *B. melitensis* se encuentran en el ganado caprino localizado en el centro, oeste y norte del país; en tanto que *B. suis* y *B. abortus* tienen mayor incidencia en la región de la Pampa Húmeda donde predomina la explotación de ganado vacuno y porcino.

Taxonomía

El género *Brucella* está incluido dentro de la familia *Brucellaceae* (familia III) conjuntamente con *Mycoplana* y *Ochrobactrum*; del orden Rhizobiales en la clase Alphaproteobacteria del filum Proteobacteria. Los miembros de la clase Alphaproteobacteria incluyen familias de organismos que son patógenos o simbioses de mamíferos o plantas. Entre los organismos que afectan a mamíferos en el Alphaproteobacteria se encuentran los géneros *Bartonella*, *Rickettsia* y *Ehrlichia*.

En las últimas décadas, la taxonomía de *Brucella*, tanto a nivel de especie como intra-especie, fue muy debatida y objeto de muchas reorganizaciones. A través de los años, los taxonomistas de *Brucella* desarrollaron un sistema de clasificación basado en la patogenicidad y preferencia por el hospedador que consta de seis especies (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* y *B. canis*) subdivididas en biotipos. En 1986, esta clasificación fue cuestionada con el argumento de que el alto grado de homología de ADN observado por hibridación ADN-ADN (similitud hasta del 99 %) demostraba que *Brucella* era un género mono-específico (*B. melitensis*) en el cual, las seis especies clásicas no serían sino bio-variedades (*B. melitensis* biovarabortus, *B. melitensis* biovarsuis, etc.) En 2003, el subcomité internacional sobre taxonomía de *Brucella* (*International Subcommittee on the taxonomy of Brucella*, ISTB), recomendó regresar a la taxonomía del género pre-1986 (las especies de *Brucella* clásicas con sus bio-variedades reconocidas).

A partir de 2007, se incluyeron en el género *Brucella* las nuevas especies *B. ceti* y *B. pinnipedialis* aisladas de cetáceos y focas, respectivamente; *B. microti*, aislada de la rata común (*Microtus arvalis*) en República Checa, años más tarde del suelo de la misma zona; *B. inopinata*, aislada de un implante mamario de una mujer con signos clínicos de brucelosis; *Brucella vulpis* aislada de ganglios linfáticos mandibulares de zorros rojos silvestres (*Vulpes vulpes*) en Austria.

El genoma de *Brucella* consta de dos cromosomas circulares, sin plásmidos, lo que sugiere una notable diferencia en comparación con el único cromosoma de muchas bacterias; su tamaño relativamente grande sugiere el potencial de existir en diferentes entornos, que puede incluir la adaptación a diferentes hospedadores, lo que puede reflejar diferencias en las estructuras de la superficie celular (pared celular) y las condiciones óptimas de crecimiento, así como mecanismos especializados para la captación y el crecimiento intracelular de patógenos de mamíferos.

Características generales

En función de la expresión o no del polisacárido O del LPS, las brucelas se clasifican en "lisas (S, *smooth*)" (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. suis* y los aislamientos marinos) y "rugosas (R)" (*B. canis*, *B. bovis* y algunas cepas vacunales). La mayoría de las cepas presentan dos cromosomas circulares. De *Brucella* se aislaron bacteriófagos pero no plásmido, permaneciendo incierta la estrategia que utilizan estas bacterias para transferir material genético, entre ellas y con otras. Basados en la alta homogeneidad genética que presenta el género, se cree que el hecho de que estas bacterias sean de vida intracelular, limita la posibilidad del intercambio.

Los métodos tradicionales para caracterización fenotípica de *Brucella* spp. son: morfología y tinción (cocobacilos gramnegativos), características culturales, oxidasa +, sensibilidad de los colorantes (fucsina y tionina), dependencia a la presencia de CO₂, producción de SH₂, tipificación por fagos, aglutinación. Las especies *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*, en base a propiedades bioquímicas e inmunológicas, se dividen en “biovars”. En la actualidad, se utilizan métodos moleculares de identificación, basados en el ADN.

Si bien las especies de *Brucella* se denominan basándose en su hospedador preferencial, todas las cepas patógenas tienen la capacidad de infectar a otros hospedadores. Bajo condiciones de campo, *B. suis* y *B. melitensis* se aislaron de bovinos; *B. abortus* de cerdos salvajes. La sintomatología clínica de la brucelosis, generalmente es más severa en hospedadores ocasionales, incluyendo al hombre, que en los preferenciales.

Al menos cuatro especies son patógenas para los humanos: *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*, consideradas altamente patógenas y *B. canis*, menos virulenta. *B. ovis* y *B. neotomae* no son consideradas zoonóticas.

Tabla 1: Potencial zoonótico y hospedador preferencial de *Brucella* spp

Especie	Hospedador preferencial	Potencial zoonótico
<i>B. melitensis</i>	Caprinos, ovinos	Alto
<i>B. abortus</i>	Bovinos	Moderado
<i>B. suis</i>	Porcinos	Moderado
<i>B. canis</i>	Caninos	Medio
<i>B. ovis</i>	Ovinos	Ausente
<i>B. neotomae</i>	Roedores desierto	Ausente
<i>B. ceti</i>	Catáceos	Medio
<i>B. pennipediae</i>	Focas	Medio
<i>B. microti</i>	Ratones	Ausente

Los integrantes del género *Brucella* son patógenos intracelulares de mamíferos. No se consideran comensales ni se encuentran libres en la naturaleza. Para su transmisión es necesario el contacto directo, requiriéndose el mantenimiento de la bacteria en un animal susceptible. Las especies virulentas (*B. abortus*, *B. melitensis*) se transmiten a través de fluidos como leche o tejidos derivados de/asociados con la parición o abortos, fetos abortados.

Patogenia

La virulencia de brucela se basa en gran medida, en su capacidad para sobrevivir y replicarse dentro de los compartimentos de las vacuolas fagocíticas de células fagocíticas y no fagocíticas (trofoblastos). Esta capacidad implica la fusión temporal de la vacuola que contiene la bacteria con el lisosoma y la posterior exclusión de las proteínas lisosomales. Luego de este proceso, la vacuola se asocia con el retículo endoplásmico (RE). Este compartimiento es el lugar de replicación intracelular de brucela dentro de los macrófagos, células epiteliales y trofoblastos. Una vez instalada puede establecer la infección crónica.

La célula blanco de *Brucella* son: macrófagos, células dendríticas y trofoblastos. Con el fin de llegar a ellas, atraviesan las barreras mucosas de los tractos respiratorio, genitourinario o digestivo donde son fagocitadas por los macrófagos residentes y las células dendríticas, dando lugar a la diseminación del microorganismo hacia órganos linfáticos y reproductivos. La invasión a través del tracto digestivo está asociada con la adhesión a las células M. La internalización epitelial transporta la bacteria desde el lumen intestinal hacia la lámina propia.

Brucella es fagocitada por los macrófagos requiriéndose la reorganización moderada de los microfilamentos de actina, este fenómeno es activado cuando la bacteria se adhiere a los receptores ubicados en la superficie de las células.

Las brucelas opsonizadas son internalizadas vía receptor Fc o receptores para el complemento, mientras que las no opsonizadas interactúan con los receptores para lectina y fibrinolectina. *Brucella* no opsonizada puede sobrevivir y replicarse dentro de las células; por el contrario, la opsonización de la bacteria o la activación de los macrófagos mediada por interferón gamma (IFN γ) o factor de necrosis tumoral alpha(FNT α), favorece la muerte de las bacterias que se encuentran en el interior de las células. Las balsas de lípidos, microdominios ricos en colesterol de la membrana celular de los macrófagos, también participan en la internalización de las bacterias. Posteriormente, los fagosomas que contienen *Brucella*, interactúan con los endosomas tempranos y tardíos. La mayoría de las brucelas fagocitadas son destruidas por acción bactericida de los radicales oxígeno, óxido nítrico y enzimas del fagolisosoma. Sin embargo, las bacterias que resisten este mecanismo y luego de la fusión con el lisosoma, pueden excluir las proteínas lisosomales y re-direccionar la vacuola que las contiene hacia el RE, donde se replica. La acidificación del fagosoma que contiene las bacterias no las daña sino que desencadena la expresión de genes que son esenciales para la supervivencia intracelular de las bacterias durante las primeras etapas de la infección.

Las células dendríticas, especializadas como procesadoras y presentadoras de antígenos, son otros fagocitos por los cuales *Brucella* presenta marcado tropismo y son infectadas más eficientemente que los macrófagos. Las estrategias de supervivencia y replicación en su interior son similares a lo que ocurre dentro de los macrófagos. Aunque el crecimiento celular es mayor. Las bacterias inhiben la maduración de las células dendríticas comprometiendo la presentación de antígenos, secreción de citoquinas y la activación de la respuesta adaptativa. Estas células tienen dos aspectos importantes que las convierte en excelentes portadoras de

brucelas: alta tolerancia al desarrollo bacteriano y ser nexa entre la respuesta inmune innata y adaptativa, presentan un perfil de migración que favorece la propagación del patógeno.

Aunque estas bacterias son capaces de invadir células trofoblásticas y epiteliales, son mucho menos invasiva que otros patógenos bacterianos intracelulares facultativos como *Salmonella enterica*. Si bien no se identificaron receptores específicos, algunas moléculas bacterianas contribuyen con la adhesión e invasión celular. *Brucella* invade las células epiteliales a través del reclutamiento de los filamentos de actina y la reorganización de la membrana de las células hospedadoras. La internalización involucra la activación de proteínas reguladoras del citoesqueleto: pequeñas GTPasas. Otros mediadores de señalización celular como GMPc, tirosina-quinasa, MAP quinasa participan como segundos mensajeros.

Las células trofoblásticas son el blanco de las brucelas durante la última fase de la gestación de los rumiantes. El crecimiento de las bacterias dentro de las células se ve beneficiado, aparentemente, por la alta concentración de hormonas esteroides y eritritol durante el último tercio de la gestación. La capacidad de replicarse rápidamente compromete la integridad de la placenta y la infección del feto, ocasionando aborto o nacimiento de animales débiles. Si la infección del feto acontece antes de la ontogenia inmune, brucela no es reconocida como elemento "no propio", por lo tanto el individuo es incapaz de montar una respuesta inmune específica contra el patógeno y si sobrevive, la cría que nace es débil y persistentemente infectada con el agravante de no poder ser diagnosticado por pruebas serológicas convencionales, constituyendo una importante fuente de infección para otros animales.

Patogénesis molecular-Factores de virulencia

Brucella no produce los factores de virulencia clásicos como exotoxinas o cápsula. Teniendo en cuenta que el tracto digestivo es la principal puerta de entrada, se estudiaron algunos posibles factores de virulencia que hagan que la bacteria pueda ingresar de forma exitosa. *B. suis*, *B. abortus* y *B. melitensis* necesitan los genes que codifican la producción de ureasa (*ure1*), enzima asociada con el metabolismo de nitrógeno, lo que ocasiona un aumento de pH por la producción de amoníaco, como resultado de la hidrólisis de la urea. Aparentemente, para que la infección gastrointestinal se establezca, también se necesitaría del sistema de secreción tipo IV y los LPS.

Durante la internalización, *Brucella* libera un sistema regulador de dos componentes (BvrR/BvrS) que regulan la expresión de proteínas de membrana externa (OMP*s*outer membrane proteins) asociadas con la invasión de células hospedadoras. Los dos componentes del sistema son ByrR, regulador de proteínas y ByrS un sensor de proteínas con actividad histidina-quinasa. Este sistema regulador se necesita para el reclutamiento de GTPasas y filamentos de actina y para mantener la integridad de la membrana externa bacteriana. También es importante para la supervivencia intracelular.

Un mecanismo adicional empleado por *Brucella* para evitar la fusión de la vacuola que contienen las bacterias con los lisosomas en los macrófagos son β -1,2-glucanos cíclicos. Los glucanos son constituyentes del periplasma bacteriano con actividad reguladora de la ósmosis y captación de colesterol; son necesarios para la supervivencia de *Brucella* en células no fagocíticas. Impiden la maduración del fagosoma al interferir con las balsas de lípidos, alterando así la expresión de proteínas en la membrana vacuolar y excluyendo proteínas lisosomales desde las vacuolas que contienen las bacterias.

Los LPS son otro factor de virulencia que contribuye con la supervivencia inicial de la bacteria en los macrófagos. La cadena lateral O polisacárida del LPS, juega un rol importante en la virulencia de las cepas lisas, en el desarrollo del fagosoma temprano. *Brucella* puede bloquear la maduración del fagosoma a través de la interacción del LPS-liso con las balsas lipídicas, lo que contribuye con la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma. Se demostró que los LPS de *Brucella* alteran la respuesta antimicrobiana inhibiendo los ataques del complemento, de los péptidos antibacterianos y evitando la síntesis de mediadores inmunes. El sistema del complemento tiene tres vías posibles que conducen a la muerte bacteriana: la clásica, la alternativa y la vía de las lectinas. La membrana de las enterobacterias y especialmente su LPS desencadenan tanto la vía clásica como la alternativa (lípidos A del LPS y cadena lateral O respectivamente). *B. abortus* tiene la particular capacidad de resistir a la actividad bactericida del suero no inmune, en parte se debe a la baja activación de la vía alternativa del complemento por su LPS particular. Se corroboró que la cadena lateral O del LPS de *B. abortus* está implicada en esta resistencia ya que las mutantes rugosas fueron más sensibles al ataque del suero normal y al complemento, por las vías clásica y lectina. La cadena lateral O del LPS de *Brucella* impide la deposición de complemento en la superficie bacteriana. La cadena lateral O de *B. abortus* bloquea el acceso de la fracción C1q a los sitios diana proteínicos de la membrana externa; esta observación condujo a la hipótesis de que la longitud y la proporción de la cadena O en la membrana bacteriana podría formar un "escudo" frente al ataque mediado por el complemento. La presencia de la cadena O en la superficie de la bacteria limita el ataque del complemento y puede ayudar en la supervivencia extracelular.

Además de bloquear la activación del complemento, los LPS de *Brucella* permiten la supervivencia de estas bacterias mediante la protección eficaz contra los péptidos catiónicos bactericidas. *Brucella* es resistente a una gran variedad de péptidos, como defensina NP-2, lactoferrina, cecropinas, lisozima, péptidos derivados de batenecina y polimixina B de tipo defensina, así como a extractos lisosómicos crudos de leucocitos polimorfonucleares. Esta resistencia se correlaciona directamente con el número bajo de grupos aniónicos en la parte del lípido A central de LPS.

Otros componentes de la membrana externa también pueden actuar como factores de virulencia: OMP₂₅ (participa en la invasión de células no fagocíticas), fosfatidilcolina (principal fosfolípido de la membrana externa) participa en la capacidad de la bacteria de evitar la fusión con los lisosomas de los macrófagos.

El sistema de secreción tipo IV (SST4) de *Brucella*, codificado por los genes *virB1-virB12*, se necesita para el crecimiento bacteriano dentro de las células fagocíticas y no fagocíticas. Es considerado factor de virulencia caracterizado por ser un aparato transportador ubicado en la membrana externa de la bacteria. Es capaz de trasladar ADN bacteriano o proteínas efectoras dentro de la célula blanco. En *Brucella* spp., aparentemente, no inyecta ADN. Las moléculas efectoras secretadas por el SST4 de *Brucella*, posiblemente jueguen un papel en la maduración del fagosoma y el tráfico de la vacuola que contiene la bacteria hacia su nicho de replicación. El SST4 también podría requerirse para inducir la expresión de varias proteínas de *Brucella* que contribuyen con su virulencia. Si bien es absolutamente necesario para la supervivencia intracelular y la replicación bacteriana, no se necesitaría para la invasión y la supervivencia intracelular inicial.

***Brucella* y la inmunidad innata**

Como se mencionó, el tracto digestivo es la principal puerta de entrada de brucela y en este sitio toma contacto con el sistema inmune asociado a las mucosas. Ya en el tracto intestinal ingresa a las células epiteliales por receptores, donde sobrevive y multiplica durante las primeras 72 horas. Luego por migración trans-epitelial atraviesa el epitelio y es reconocida y endocitada por células centinelas del sistema inmune, como las células M, macrófagos y células dendríticas, donde el 10 % de las bacterias fagocitadas sobrevive.

La NK es el linfocito de la inmunidad innata involucrado en la detección de microorganismos de vida intracelular, responsable en la inducción de la muerte celular pero sobretodo es la mayor fuente de IFN γ y en el foco infeccioso, estimulando su propia activación y la de los macrófagos.

La respuesta inmune contra esta bacteria se basa en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos microbianos (PAMPs), como lipoproteínas, lipopolisacáridos y ADN. Varios mecanismos contribuyen con la evasión de la inmunidad innata. Primero, *Brucella* spp. reduce, modifica u oculta sus PAMPs y en este sentido produce un LPS que tiene propiedades endotóxicas débiles y particularmente el lípido A representa un ligando menos potente para el TLR4. A pesar de esto, algunos TLR como TLR2 que reconoce lipoproteínas, TLR9 que reconoce ADN CpG, e inclusive el TLR4. También se demostró la capacidad inmuno-estimulante del ARN bacteriano en infecciones por brucela, en el reconocimiento de este PAMPs están involucrados TLR 7 y 3, estimulando la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-2, IL-6, quimiocinas CXCL10.

El estímulo específico de estos PRRs logra desencadenar la activación de esta vía de señalización que a su vez activa al factor de transcripción NF- κ B que controla la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, quimiocinas, moléculas de co-estímulo necesarias para la activación de linfocitos, entre otros factores. *Brucella* desencadena una respuesta inflamatoria

10 veces menos intensa comparada con *Salmonella* spp., que se traduce en una infiltración reducida de neutrófilos. Otro factor que inhibe la vía de señalización TLR son ciertas proteínas capaces de unirse a proteínas adaptadoras y proteínquinas que intervienen en la vía. El ingreso en fagocitos especializados protege a la bacteria de los efectores del sistema inmune innato como leucocitos polimorfonucleares (PMN), sistema de complemento y anticuerpos naturales y específicos durante la respuesta adaptativa.

La composición química particular de la cadena lateral O del LPS de las cepas lisas, también colabora con la inhibición de la respuesta inmune. Los macrófagos tienen gran dificultad en degradar la perosamina de la cadena lateral O del LPS de *Brucella*, esta cadena no digerida inhibe directamente la acción de los macrófagos infectados en presentar epitopes antigénicos a los LT CD4 vía el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) tipo II.

Queda claro que los mecanismos de resistencia esgrimidos por *Brucella* spp. no son lo suficientemente efectivos para que la infección sea exitosa. Brucela y otros microorganismos de vida intracelular, modulan el sistema inmune innato con el único propósito de establecerse en un nicho replicativo de resistencia prolongada. Una vez endocitada y en el interior de la célula fagocítica mononuclear, la brucela se adapta a las nuevas condiciones de supervivencia intracelular y modifica al endosoma que se transforma en un compartimento replicativo denominado bruceloma. Sin embargo, en este periodo de adaptación a las nuevas condiciones (limitada disponibilidad de nutrientes, fuentes alternativas de energía, baja tensión de oxígeno) adopta un estado en el que disminuye la activación de genes y la síntesis proteica.

Otro mecanismo que colabora con la supervivencia, favorece la multiplicación y permanencia prolongada de brucela en el organismo favoreciendo la instauración de la cronicidad de la infección, es el sistema de SST4 que recluta células implicadas en la formación del microgranuloma. Estos pueden representar un sitio de persistencia bacteriana en el hospedador hasta la siguiente etapa reproductiva.

Limitar la respuesta inflamatoria, inhibir la apoptosis de células mononucleares infectadas, entorpecer las vías de señalización disminuyendo la expresión de moléculas y citoquinas involucradas en la maduración de las células dendríticas con el consiguiente retraso en la activación de las células del sistema inmune adaptativo, posiblemente atenúe o dilate la aparición de esta respuesta inmune específica. Esta inteligente estrategia le permite a la bacteria la invasión, supervivencia y diseminación en el hospedador favoreciendo su carácter crónico.

***Brucella* y la inmunidad adaptativa**

Una vez que las células dendríticas procesaron al antígeno por sus diferentes vías en el órgano linfático secundario regional, tienen la función de activar a los LT, siendo las únicas células capacitadas para activar a un LT virgen. Estos LT que nunca contactaron con su péptido antigénico específico, reciben señales de activación induciendo su diferenciación a linfocitos efectores, como linfocitos CD8 citotóxicos y linfocitos CD4 *helper* o colaboradores y sus subpoblaciones (LT CD4 colaborador Th1, Th2; LT CD4 colaborador folicular; o regulador,

entre otros). Tanto los LT CD8 citotóxicos como las diferentes subpoblaciones de LT CD4 colaboradores, proliferan y el producto de la activación son linfocitos efectores y de memoria. Los linfocitos efectores emigran de los órganos linfáticos secundarios al foco infeccioso y allí despliegan sus herramientas para colaborar con la eliminación del patógeno. La inmunidad innata recibe entonces la colaboración de la inmunidad adaptativa propiciando la interacción entre LT CD4 colaboradores y LT CD8 citotóxicos, macrófagos y células dendríticas que actúan conjuntamente con otros mecanismos del sistema inmune para eliminar al patógeno.

La respuesta inmune eficaz contra microorganismos de vida intracelular como *Brucella* está mediada por la respuesta inmune celular específica, LT CD4 colaboradores Th1 y está asociada a la producción de IFN- γ y FNT- α . La secreción de IL-12 y/o IL-18 por las células presentadoras de antígeno actúan sinérgicamente por diferentes vías, para inducir la producción de IFN- γ , FNT- α e IL-2 por las células T CD4 colaboradores Th1. Tanto IFN- γ y FNT- α son los responsables de potenciar la activación de los mecanismos dependientes de oxígeno que intervienen en la muerte de los patógenos, transformando al macrófago en "macrófago activado", entidad celular capacitada para eliminar más eficientemente a las brucelas intracelulares.

Los LT CD8 citotóxicos son los responsables de la eliminación de las células infectadas por inducción de muerte por apoptosis. Este modo de eliminación evita la diseminación ya que los cuerpos apoptóticos que contiene restos celulares y microorganismos de vida intracelular, como la brucela, son reconocidos desencadenándose el proceso de endocitosis por parte de macrófagos y/o células dendríticas. La prevención de la apoptosis de la célula hospedadora puede ser un mecanismo utilizado por estas bacterias para facilitar la supervivencia intracelular y la persistencia.

En general, se considera que los anticuerpos no tienen mayor importancia en la protección contra la infección por brucela. Las bacterias opsonizadas son fácilmente fagocitadas y si las opsoninas son anticuerpos el reconocimiento vía receptor Fc promueve la eliminación por estallido respiratorio. En un contexto donde predominan citoquinas como IL-4 e IL-10 se promueve una respuesta humoral de perfil TH2 que no estimula la activación de los macrófagos, por lo tanto no conduce a una respuesta protectora. Probablemente esto es lo que sucede después del reconocimiento y procesamiento de brucelas muertas. El inmunógeno que predomina en la respuesta humoral es el LPS que como ejemplo de antígeno timo-independiente tiene la capacidad de estimular una respuesta humoral importante, la cual no tiene injerencia en la protección pero es el fundamento del diagnóstico serológico, estrategia fundamental del control.

Control de la enfermedad y epidemiología

La brucelosis bovina causa grandes pérdidas económicas en las explotaciones pecuaria por disminución de la producción y pérdidas en el mercado internacional, sumado a su condición

de zoonosis, para combatirla muchos países presentan programas de control y erradicación de brucelas altamente patógenas (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*). Después de diferentes resoluciones que establecían la vacunación obligatoria en nuestro país, pasando por el Plan Nacional de Control y Erradicación de la Brucelosis y Tuberculosis Bovina, en el 2002 se consolida el Programa de Control y Erradicación de la Brucelosis Bovina en todo el territorio, estableciendo las exigencias mínimas de cumplimiento con el objetivo de asegurar en forma progresiva la condición de áreas libres de la enfermedad y permitir en forma coordinada, su control y posterior eliminación. Las medidas de control incluyen: 1- la vacunación anti-brucela obligatoria para el cien por cien (100 %) de las terneras de tres a ocho meses de edad con vacuna *Brucella abortus* Cepa 19, en simultáneo con las campañas de vacunación anti-aftosa y bajo una estrategia regional; 2- controles de egreso de hacienda tanto para tambo y carne; y 3- la vigilancia epidemiológica de todos los establecimientos procesadores de leche y fabricantes de productos lácteos que deberán realizar el diagnóstico serológico en leche, cada dos meses. Se utilizan como prueba tamiz la de Anillo en Leche y/o ELISA indirecto, realizadas en laboratorios que estén habilitados por la Red Nacional de laboratorios acreditados.

La vacuna contra la brucelosis es una vacuna viva, homóloga, convencional cuyo inmunógeno vacunal es la cepa 19, atenuada naturalmente. La vía de administración es subcutánea o intramuscular, una sola dosis en las hembras. Los machos no se vacunan. La edad de vacunación permite una respuesta inmune protectora y también adecuada para evitar ser detectada por las pruebas diagnósticas disponibles. Una vacuna eficaz previene la enfermedad, evita los abortos y nacimientos de animales débiles o portadores, pero no previene la infección. Si bien esta infección es transitoria, es suficiente para inducir una fuerte respuesta inmune que puede ser detectada con las pruebas diagnósticas disponibles.

Las pruebas diagnósticas para esta enfermedad se vienen desarrollando desde 1897. Las tradicionales o convencionales más utilizadas en nuestro país son pruebas de aglutinación que conforman un algoritmo de diagnóstico. BPA se utiliza como tamiz y Wright y 2-mercaptoetanol como confirmatorias de los resultados positivos. También se utiliza ELISA indirecto y de competencia, la prueba del FPA que presentan mejores características operativas que las convencionales. Estas últimas pueden utilizarse directamente como diagnósticas, así como confirmatorias de la prueba tamiz BPA. Ninguna de éstas es capaz de diferenciar anticuerpos post-infección de los anticuerpos vacunales, por lo tanto la estrategia para el diagnóstico específico de infección por *B. abortus* es respetar la edad de vacunación y realizar el diagnóstico pre-sevicio, las características operativas de las diferentes pruebas y su combinación en el diagnóstico, nos permite determinar con alto grado de eficacia los animales infectados minimizando los riesgos de resultados falsos positivos a anticuerpos vacunales.

Por último y aplicado a cualquier caso, debe tenerse en cuenta que un resultado seropositivo no necesariamente indica que el animal está infectado o sea capaz de transmitir la enfermedad.

Referencias

- de Figueiredo P, Ficht TA, Rice-Ficht A, Rossetti AC and Adams LG. Pathogenesis and Immunobiology of Brucellosis Review of Brucellae Host Interactions. *American J Pathol.* 2015; Vol. 185, No. 6.
- Christopher S, Umapathy BL, Ravikumar KL. Brucellosis: Review on the Recent Trends in Pathogenicity and Laboratory Diagnosis. *J Lab Physicians.* 2010; 2(2): 55-60. doi:10.4103/0974-2727.72149.
- Ficht T. *Brucella* taxonomy and evolution. *Future Microbiol.* 2010; 5(6): 859-66. doi:10.2217/fmb.10.52.
- 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(5): 1570-9. doi: 10.1128/AEM.03755-13
- International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006; 56: 1173-5. doi: 10.1099/ijs.0.64349-0.
- Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel JP. Brucella lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol.* 2005; 8:60-6.
- Moreno E, Cloeckaert A, Moriyón I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol.* 2002; 90: 209-27.
- Nymo IH, Tryland M, Godfroid J. A review of *Brucella* infection in marine mammals, with special emphasis on *Brucella pinnipedialis* in the hooded seal (*Cystophora cristata*). *Vet Res.* 2011, 42:93. doi: 10.1186/1297-9716-42-93
- Russo AM, Mancebo OA, Monzón CM, Gait JJ, Casco RD, Torioni de Echaide SM Epidemiología de la brucelosis caprina y ovina en la provincia de Formosa, Argentina. *Rev Arg Microbiol.* 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2015.10.005>.
- Scholz HC, Hubalek Z, Sedláček I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Melzer F, Kämpfer P, Neubauer H, Cloeckaert 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: 375-82. doi: 10.1099/ijs.0.65356-0.
- Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Kämpfer P, Cloeckaert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, De

- BK.*Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. Int J Syst Evol Microbiol. 2010; 60: 80-8. doi: 10.1099/ijms.0.011148-0.
- Scholz HC, Revilla-Fernández S, Al Dahouk S, Hammerl JA, Zygmunt MS, Cloeckert A, Koylass M, Whatmore AM, Blom J, Vergnaud G, Witte A, Aistleitner K, Hofer E. *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). Int J Syst Evol Microbiol. 2016; 66(5): 2090-8. doi: 10.1099/ijsem.0.000998.
- SENASA. Programa de Control y Erradicación de la Brucelosis Bovina. 2017. Resolución Senasa N° 150/200.
- Xavier MN, Paixão TA, den Hartigh AB, Tsois RM, Santos RL. Pathogenesis of *Brucella* spp. Open Vet Sci J. 2010; 4:109-18.

CAPÍTULO 6

Clostridios Neurotóxicos

Javier Uriarte

Clostridium son bacilos grampositivos que se observan solos, de a pares o en cadenas cortas. Con excepción de *C. perfringens*, son móviles debido a la presencia de flagelos peritricos. Algunas especies expresan cápsula y forman esporas esféricas u ovaladas de ubicación central, subterminal o terminal, pudiendo deformar el soma bacteriano. A pesar de ser bacterias anaerobias obligadas, no todas tienen la misma sensibilidad frente al oxígeno. *C. tetani*, por ejemplo, requiere anaerobiosis total, una mínima concentración de oxígeno es tóxica para esta bacteria, mientras que *C. perfringens* es menos exigente (aerotolerante). Sus principales factores de virulencia son las exotoxinas que producen. Son bacterias fermentadoras que, con la finalidad de obtener nutrientes y energía necesarios para su crecimiento, secretan numerosas enzimas hidrolíticas capaces de degradar una amplia variedad de sustratos orgánicos.

Entre las más de 200 especies que integran el género *Clostridium*, aproximadamente 15 son las que producen potentes toxinas capaces de ocasionar enfermedades severas en humanos y animales. Si bien los clostridios patógenos no son microorganismos invasivos, las moléculas activas que secretan actúan a cierta distancia de donde se producen y liberan. Estas bacterias pueden ingresar al organismo por dos vías diferentes: oral o a través de soluciones de continuidad de la piel. La vía oral les permite, independientemente de los factores de riesgo, crecer y producir toxinas en alguno de los compartimentos del tracto digestivo, desencadenando la enfermedad intestinal o transmitida por alimentos. El ingreso a través de soluciones de continuidad de la piel, permite el desarrollo de las bacterias en el tejido necrótico (condición de anaerobiosis), con la consecuente producción local de las toxinas, que ocasionan gangrena o enfermedades neurológicas como tétanos. En el caso del botulismo, el consumo de toxina pre-formada (toxi-infección) es suficiente para causar enfermedad.

Las toxinas clostridiales (TC) incluyen una gran variedad de proteínas que se diferencian por su tamaño, estructura, mecanismo de acción, habilidad para diseminarse por el organismo hospedador y el sitio de acción. Algunas toxinas actúan de forma local, mientras que otras atraviesan la barrera mucosa diseminándose a los diferentes tejidos vía circulación sanguínea, por ejemplo, la neurotoxina botulínica atraviesa la mucosa intestinal y se une a las terminales

nerviosas mientras que la toxina tetánica es transportada hacia el SNC y la ϵ -toxina puede atravesar la barrera hemato-encefálica.

Las toxinas que tienen la capacidad de interactuar con diferentes tipos de células generalmente están asociadas con la producción de gangrena, otras lo hacen sobre células específicas como los enterocitos causando enteritis, enterocolitis necrótica y/o hemorrágica o las neuronas, ocasionan desórdenes neurológicos como botulismo y tétanos.

En función del sitio de acción, las TC se dividen en: a) las que actúan sobre las membranas celulares (toxinas formadoras de poros y fosfolipasas) y b) las que tiene un sitio diana en el interior de las células, ingresan al citoplasma e interactúan por ejemplo con actina, GTPasas o a alguna de las proteínas asociadas con la exocitosis.

Aproximadamente un tercio de las TC son “toxinas formadoras de poros”. Este mecanismo, podría ser utilizado para la obtención de los nutrientes liberados desde las células. El resto de las TC son enzimas hidrolíticas extracelulares específicas las cuales modifican sitios vitales de las células eucariotas, ocasionando la muerte inmediata o una alteración irreversible de alguna de sus funciones esenciales.

C. botulinum y *C. tetani* son agentes patógenos conocidos desde el siglo XVIII, que causan las enfermedades comúnmente conocidas como Botulismo y Tétanos. Los esporos de *C. tetani* son esféricos, de ubicación terminal y generalmente deforman el soma bacteriano, que al ser observado al microscopio, presenta la típica forma de palillo de tambor. *C. botulinum*, tiene espora oval de ubicación central o subterminal y no deforma el soma bacteriano. Bajo condiciones ideales, los esporos pueden germinar a sus formas vegetativas en solo 30 minutos. La rápida transformación de *C. botulinum* a la fase vegetativa, puede llevar a la muerte de gallinas luego de la inoculación de 10 esporos. La temperatura óptima de crecimiento y toxigenesis de *C. tetani* es 37 °C, sin embargo, para *C. botulinum* puede llegar a 45 °C. Al igual que la mayoría de los clostridios, son bacterias telúricas y de distribución mundial. *C. tetani* es habitante frecuente del tracto gastrointestinal mientras que *C. botulinum* fue hallado en hígado de cerdos clínicamente sanos en frigorífico. Este último es capaz de producir *biofilm*, reduciendo consecuentemente su sensibilidad a los antibióticos lo que resulta en la persistencia de la infección, pudiendo explicar el motivo por el cual se encuentra en materia fecal de niños tratados con antibióticos durante varios meses.

Recuperando saberes

Los neurotransmisores, acetilcolina, catecolaminas (dopamina, adrenalina y noradrenalina) y algunos aminoácidos y sus derivados (histamina, serotonina y ácido γ -aminobutírico (GABA), glicina y glutamato), antes de su liberación se almacenan en pequeñas vesículas en los botones terminales. Como consecuencia del incremento de calcio en este sitio, estas vesículas se movilizan rápidamente para ser liberadas (las neuronas mantienen las vesículas en reserva unidas al citoesqueleto, de forma que no se pueden acercar a la membrana sináptica para su secreción). Para que este proceso ocurra, se adicionan grupos fosfato a la sinapsina, una proteína integral de membrana presente en la membrana de las vesículas neurosecretoras. Al encontrarse fosforilada, la sinapsina no permanece unida al citoesqueleto, liberando las vesículas de forma que comienza el siguiente paso para la liberación del neurotransmisor, la fusión con la membrana plasmática. Las vesículas se desplazan para contactar con la membrana plasmática del terminal axónico y fundirse con ella para liberar su contenido en el espacio sináptico. Las vesículas sinápticas, las proteínas a las que se unen las vesículas y los canales de calcio que producen su liberación están agrupados en filas ordenadas, dispuestas para la secreción. La estrecha proximidad de los canales de calcio a las vesículas ayuda a explicar la extremadamente rápida fusión de la población de vesículas activadas y susceptibles de ser liberadas con la membrana plasmática neuronal, cuando la neurona es estimulada. El anclaje y la fusión de las vesículas están mediados por proteínas de anclaje dentro de la vesícula y dentro de la membrana plasmática de la zona activa. En la membrana de la vesícula, sinaptotagmina, sinaptobrevina y otras proteínas se anclan a proteínas como la syntaxina de la zona activa de la membrana plasmática. Una vez que se produce el anclaje inicial algunas proteínas adicionales del citosol estabilizan la unión, formando un complejo de anclaje multi-proteico.

Las neuronas post-sinápticas tienen receptores específicos para los neurotransmisores. La acetilcolina se une a un canal de sodio dependiente de ligando, más conocido como receptor de acetilcolina. Cuando se unen dos moléculas de acetilcolina, el canal se abre y permite la entrada de sodio en la neurona post-sináptica, produciendo la despolarización.

Independientemente de que sea excitado un inhibidor, una vez que se secretó un neurotransmisor, éste debe ser retirado rápidamente del espacio sináptico mediante dos mecanismos específicos posibles, degradación a moléculas inactivas o re-captación por la terminal pre-sináptica. La acetilcolina supone un ejemplo del primer mecanismo. La enzima acetilcolinesterasa hidroliza a la acetilcolina en ácido acético (o ion acetato) y colina, ninguno de los cuales estimula al receptor de acetilcolina. La re-captación es un método mucho más común para detener la transmisión sináptica. Proteínas transportadoras específicas en la membrana del terminal pre-sináptico bombean al neurotransmisor hacia las terminales axónicas pre-sinápticas. El ritmo de re-captación de neurotransmisor puede ser muy rápido; para algunas neuronas, la sinapsis debe ser limpiada de neurotransmisor dentro de un periodo tan breve como 1 milisegundo. Ya que el neurotransmisor re-captado puede ser reciclado y

utilizado nuevamente, la neurona pre-sináptica debe sintetizar una menor cantidad de neurotransmisor nuevo. La re-captación se realiza por endocitosis.

Toxinas

Las neurotoxinas clostridiales (NTC), botulínica (BoNT) y tetánica (TeNT), son las proteínas más tóxicas para los seres humanos. La intoxicación con BoNT produce parálisis flácida debido a la inhibición de la liberación de acetilcolina por parte de las neuronas motoras, mientras que la parálisis ocasionada por TeNT es espástica y se atribuye al bloqueado de la liberación de neurotransmisores inhibitorios en las inter-neuronas de la médula espinal.

C. tetani solo produce un tipo de neurotoxina tetánica mientras que la producción de NTC por *C. botulinum* es más heterogénea, dividiéndose sobre la base de características fenotípicas y genotípicas en cuatro grupos. Inclusive, algunas cepas de otras especies como *C. butyricum* y *C. baratii* pueden producir toxinas relacionadas con BoNT tipo E y F respectivamente. En base a propiedades antigénicas, se distinguen siete toxintipos de BoNT (A, B, C1, D, E, F y G) los cuales se dividen en subtipos

BoNT y TeNT tienen estructura similar. Son sintetizadas como precursores proteicos de aproximadamente 150 kDa inactivos o débilmente activos que las bacterias producen y liberan posiblemente a través de mecanismos de exfoliación de su pared. Estos precursores son proteolíticamente activados en el medio extra-bacteriano, ya sea por proteasas clostridiales o proteasas exógenas como las que se encuentran en el contenido intestinal. Las neurotoxinas activas están formadas por una cadena liviana (50 kDa; CL) y una pesada (100 kDa; CP) unidas por un puente disulfuro. La porción C-terminal de la cadena pesada de las toxinas media la unión con la membrana pre-sináptica de la neurona, mientras que la porción N-terminal está asociada con la translocación de la cadena liviana del endosoma al citosol. La cadena liviana específicamente rompe las proteínas y juega un papel fundamental en la fusión de la vesícula sináptica con la membrana pre-sináptica, actuando de esta manera sobre la liberación de neurotransmisores.

Si bien BoNT y TeNT utilizan diferentes vías, el mecanismo de acción intracelular es similar. Ambas inhiben la liberación de neurotransmisores. BoNTs ingresan al organismo por vía oral o se producen directamente en el intestino después de haber sido colonizado por *C. botulinum*, luego atraviesa la mucosa digestiva, difunde dentro del fluido extracelular e ingresa a circulación general. Su sitio final son las terminaciones de las neuronas motoras. En contraposición, TeNT se produce en las heridas colonizadas por *C. tetani*, difunde por fluido extracelular y sus blancos pueden ser terminales nerviosas diversas como sensoriales, adrenérgicas y motoras, aunque principalmente es transportada aún retrógrada a través de las neuronas motoras. BoNTs son endocitadas por estas neuronas durante el reciclaje de vesículas. La acidificación del lumen de las vesículas facilita la captación del neurotransmisor y el cambio de pH da lugar a la translocación de la cadena liviana a través de la membrana hacia el citosol. La intoxicación de la neurona motora produce pérdida de la señalización estimuladora entre la

neurona y el músculo, produciendo parálisis flácida. Por el contrario, TeNT es endocitada por neuronas motoras a través de un mecanismo dependiente de clatrina³ y Rab5y posteriormente el tráfico retrógrado al soma en Rab7⁴ vesículas enriquecidas que tienen pH neutro. Los receptores de neurotrofina, la toxina del cólera y el adenovirus canino-2 también utilizan esta vía retrógrada. Luego de la transcitosis de la neurona motora en una inter-neurona inhibidora, la cadena liviana ingresa al citosol y escinde VAMP2 (del inglés *vesicle-associated membrane protein*), que inhibe el ciclo de las vesículas. La pérdida resultante de esta señalización inhibitoria a la neurona motora conduce a la parálisis espástica característica del tétanos.

BoNT y TeNT reconocen receptores específicos ubicados en las terminaciones nerviosas terminales desmielinizadas. Constan de dos partes: un gangliósido⁵ de la serie G1b asociado a una proteína de membrana. La alta afinidad de estas neurotoxinas por las membranas pre-sinápticas probablemente resulte de múltiples interacciones sinérgicas con el gangliósido y parte de las proteínas de los receptores; la unión con los gangliósidos induce cambios conformacionales en el dominio de la cadena pesada, esto probablemente facilitaría la posterior unión a la parte proteica del receptor.

Las neurotoxinas unidas a su receptor son internalizadas por endocitosis. Una diferencia esencial entre ambas es que BoNT es endocitada directamente en vesículas rodeadas con clatrina, que, cuando se acidifican, activan la translocación de la cadena liviana al citosol. Por lo cual, la cadena liviana ingresa en el sistema nervioso periférico, en la unión neuromuscular bloqueando la liberación de acetilcolina y produciendo parálisis flácida. Por el contrario, TeNT ingresa en vesículas endocíticas no acidificadas. Las vesículas transportan retrógradamente la toxina, dependiendo de los microtúbulos, al cuerpo de las neuronas de la médula espinal. El fragmento C-terminal de TeNT es el que impulsa su transporte retrógrado. TeNT realiza una migración transináptica y alcanza su blanco, que son las inter-neuronas inhibitorias implicadas en la regulación de las neuronas motoras. TeNT ingresa en las inter-neuronas inhibitorias a través de vesículas acidificadas, permitiendo la entrada de la cadena liviana al citosol, inhibiendo la liberación regulada de glicina y γ -ácido amino butírico (GABA). De forma similar, BoNT entra en una vía ácida en los extremos terminales de neuronas motoras y bloquea la liberación de acetilcolina. La acidificación de la vesícula desencadena un cambio conformacional de la neurotoxina y la translocación de la cadena liviana en el citosol. Las cadenas pesadas forman tetrámeros y se insertan en las membranas lipídicas formando canales selectivos de cationes, permeables a moléculas pequeñas. La parte N-terminal de la cadena pesada media la translocación de la cadena liviana en el citosol endosomal ácido, modificando las interacciones electrostáticas con los fosfolípidos sin cambios conformacionales. A continuación, la cadena liviana se repliega en el pH neutro del citosol. Las cadenas livianas

³Clatrina: proteína que forma una «caja» alrededor de las vesículas y fosas cubiertas, implicadas en la endocitosis y otras formas de transporte intracelular.

⁴Rab5 y Rab7 son las proteínas Rab mejor caracterizadas en el proceso endocítico y en la maduración del fagosoma. Rab5 se asocia principalmente con endosomas y fagosomas tempranos controlando su identidad y funcionalidad. Rab7 define los endosomas y fagosomas tardíos y está implicado en el transporte a través de estos compartimentos.

⁵Gangliósidos. Glicolípidos que tiene un grupo principal oligosacárido que contiene uno o más residuos de ácido siálico cargados negativamente, que le proporcionan a la molécula carga neta negativa. Los cerebrósidos y los gangliósidos predominan especialmente en las membranas cerebrales y en las células nerviosas. Los gangliósidos expuestos en la superficie de la membrana plasmática también funcionan como antígenos.

de las NC son proteasa dependientes de zinc, que cortan las proteínas SNARE⁶ específicas de las neuronas. Si bien estas toxinas comparten el mismo mecanismo de acción, producen signos clínicos opuestos, esto indica claramente que son consecuencia del sitio de intoxicación y no de diferentes mecanismos de acción.

Tétanos

El tétanos, descrito ya en *corpus hypocraticus* en el siglo IV (ac), es una enfermedad infecciosa, frecuentemente mortal, ocasionada por *C. tetani*. En la actualidad continúa siendo un importante problema para la salud pública en muchas partes del mundo, especialmente en los países tropicales en desarrollo, donde el “tétano materno y neonatal” tiene alta prevalencia.

Toxinas tetánicas (TeNT)

Clostridium tetani produce principalmente dos toxinas, Tetanospasmina (TeNT) y Tetanolisina, siendo la primera la de mayor importancia en medicina humana y veterinaria. La dosis letal mínima de TeNT por ruta parenteral es de aproximadamente 0,1 ng/kg en humanos y animales, siendo los caballos la especie más susceptible. A diferencia de la toxina botulínica, TeNT es un péptidosensible a los ácidos gástricos, lo que explicaría posiblemente, la falta de toxicidad cuando se la ingiere. Las heridas punzantes contaminadas son la puerta de entrada más común de *C. tetani*, ya que el crecimiento de microbiota contaminante asociada con la isquemia propia de la lesión, facilita la creación de un ambiente anaerobio para la proliferación de esta bacteria. La castración y el descornado, especialmente mediante la utilización de una banda elástica, puede también ser un lugar apropiado para el desarrollo de la infección.

Signos clínicos

El periodo de incubación del tétano varía entre 7 y 21 días, pudiendo ser menor en especies muy susceptibles como los equinos. Los signos clínicos son similares en todas las especies, comenzando con renuencia al movimiento, rigidez muscular (especialmente en cuello y miembros) y temores. Uno a tres días después del inicio de los signos clínicos puede ocurrir una contracción generalizada de los músculos con extensión de cabeza, cuello y cola erguida. Ruidos sorprendidos, fuertes o la exposición a luces brillantes pueden desencadenar una sobre-reacción llevando a convulsiones clónicas. Los espasmos inicialmente duran algunos segundos o minutos para luego hacerse continuos. Cuando los animales se caen, tienen dificultad para levantarse, para masticar, para deglutir y hay un aumento de la salivación. Es una enfermedad polisistémica, actuando no solo sobre los músculos sino también nervios

⁶ SNARE. Las proteínas SNARE facilitan la fusión de vesículas sinápticas a la membrana plasmática. SNARE clivada inhibe la fusión lo que resulta en la pérdida de señalización neuronal.

autónomos afectando el sistema endocrino y vascular, pulmones, riñones y tracto gastrointestinal. La tasa de letalidad en animales no tratados es del 80%.

Diagnóstico

El reconocimiento de los signos clínicos es la principal estrategia para diagnosticar la enfermedad. NTTe no se detecta por análisis de laboratorio de rutina. El examen *pos-mortem* y la confirmación de laboratorio no suele ser necesaria. La toxina tetánica puede ser detectada realizando estudios en ratones de laboratorio utilizando antisueros específicos o también realizando estudios bacteriológicos de las heridas sospechosas.

El diagnóstico diferencial de esta enfermedad debe realizarse principalmente de intoxicación por estricnina o rabia en caso de carnívoros y de encefalomiелitis virales en equinos y vacunos.

Tratamiento

Cuando los signos clínicos de la enfermedad ya son obvios la prognosis es pobre aun con tratamiento. En caso que se sospeche, el tratamiento debe iniciarse lo antes posible utilizando suero equino híperimmune vía endovenosa. El suero puede neutralizar la toxina libre en el sistema circulatorio, pero no tiene efecto en las que ya alcanzaron sus células blanco, por lo que el cuadro clínico puede complicarse aun pos-tratamiento. En estos casos se puede aplicar antitoxina directamente en el espacio sub-aracnoideo.

Los animales no vacunados que presentan heridas corto-punzantes deben tratarse con antibióticos y toxina antitetánica, especialmente en equinos. Para contrarrestar el efecto de la toxina, se pueden administrar relajantes musculares o sedantes. Los animales deben permanecer aislados en ambientes oscuros y sin ruido sobre camas blandas para evitar el decúbito.

Prevención y Control

La inmunidad al tétanos está mediada por anticuerpos y depende de la capacidad de las antitoxinas para neutralizar la NTTe. La recuperación de las manifestaciones clínicas no confiere protección contra la enfermedad en el futuro; la inmunidad sólo puede obtenerse mediante inmunización activa o pasiva. En especies cuyo tipo de placenta sea hemocorial, la antitoxina tetánica materna se transfiere al feto a través de la placenta.

En animales, las vacunas comerciales consisten en toxina formolada con adyuvantes. Una serie de dos dosis con 4 a 6 semanas de intervalo debe ser aplicada con un *booster* anual, recomendándose que en las yeguas sea cada 6 meses. Esto no solo resulta en inmunidad calostrual que dura hasta los 2 o 3 meses de vida, sino que también tiene como objetivo primordial mantener niveles altos de concentración de anticuerpos durante toda la vida.

Botulismo

La causa más común de ocurrencia de la enfermedad es debido a que los esporos logran introducirse en el alimento durante su manejo, por ejemplo, los silos ofrecen los nichos anaeróbicos perfectos para la proliferación de *C. botulinum*, especialmente cuando ocurre una acidificación ineficiente. La NTBo producida en estos ambientes con altos niveles de proteínas ingresan generalmente al organismo por vía oral (solo en casos esporádicos por inhalación) siendo esta intoxicación, la forma más común de botulismo. Otra causa de ocurrencia de la enfermedad es debida a la ingestión directa de los esporos o formas vegetativas de la bacteria que dan como resultado la multiplicación del microorganismo dentro del tracto gastro-intestinal del hospedador donde se produce la BoNT, causando una toxico-infección.

Toxina Botulínica

Se describieron ocho tipos de neurotoxinas botulínicas (BoNT A - H). La potencia de la BoNT varía con el tipo de toxina y la especie del hospedador con un rango de 0,1 a 1 ng/kg vía parenteral. La toxicidad vía oral de las toxinas A y B es 1000 veces menor. La mayoría de *C. botulinum* producen una sola de ellas y solo algunos pocos producen 2. La producción de BoNT no está solo limitada a *C. botulinum*, *C. butyricum* puede producir NTBo/E y *C. baratti* puede producir BoNT/F. Cuando la BoNT se asocia a proteínas forman complejos, que difieren en tamaño y estructura dependiendo del tipo de toxina, tipo de cultivo y medio ambiente. Estos complejos son estables bajo condiciones de acides, protegiendo a la toxina por el paso a través del estómago, disociándose de ella a pH mayor a 7,2.

Las toxinas atraviesan el tracto gastro-intestinal ya sea mediante un proceso de endocitosis o trans-celulares alcanzando el sistema vascular y linfático. Cuando los complejos tóxicos llegan al sistema vascular se disocian y liberan las toxinas. La barrera hemato-encefálica no es permeable a la BoNT, pero logra filtrarse del sistema vascular mediante un mecanismo desconocido y llega a su destino final en el extremo de los nervios colinérgicos periféricos. BoNT se une a los receptores de la superficie celular de la membrana pre-sináptica e inducen su endocitosis. La proteína de la vesícula sináptica SV2 y un gangliosido son los receptores de la BoNT tipo A. La expresión de la toxina es probable que ocurra en el final o el principio de la fase estacionaria del crecimiento bacteriano y está regulada por factores ambientales y nutricionales.

Signos clínicos

La intensidad de la infección y la rapidez de los signos clínicos dependen del tipo de BoNT actuante, la cantidad de toxina absorbida y la duración de la misma en el hospedador. Los

animales más activos son generalmente los más afectados, ya que no solo ingieren más alimento, por lo tanto más toxina, sino que también estas alcanzan con mayor rapidez sus células blanco. La enfermedad puede tener tres presentaciones: hiper-aguda, aguda o crónica.

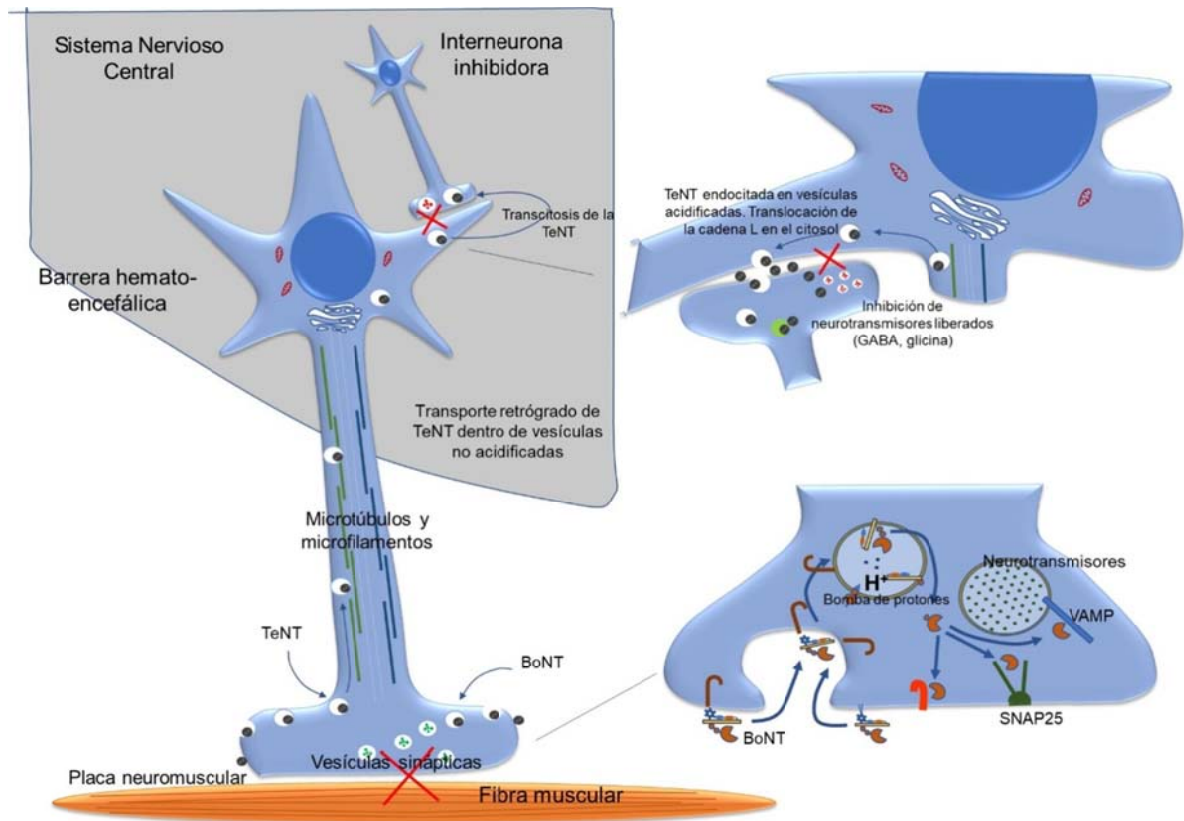


Figura 1. Mecanismo de acción de las neurotoxinas tetánica y botulínica. La BoNT ingresa la neurona motora de la placa neuromuscular a través de vesículas acidificadas que permiten la translocación de su cadena L en el citosol y su subsecuente actividad proteolítica sobre las proteínas SNARE. En contraposición, la TeNT se transporta por los axones, vía retrógrada en vesículas no acidificadas. En el sistema nervioso central, ingresa en las interneuronas inhibitorias a través de vesículas acidificadas, lo que ocasiona la activación intracelular de la toxina. La BoNT inhibe la liberación de acetilcolina en la placa neuromuscular, ocasionando parálisis flácida, mientras que TeNT bloquea la liberación de neurotransmisores de las interneuronas inhibitorias, ocasionando una parálisis espástica.

Enfermedad hiperaguda

Altas cantidades de toxina ingerida en poco tiempo puede causar muerte súbita sin signos clínicos.

Enfermedad aguda

Los animales, en un principio, tienen dificultad para levantarse o echarse, por lo que generalmente se los observa alimentándose en decúbito, luego la parálisis progresiva del esófago y lengua hace que alimentarse sea imposible, observándose masticación, pero no deglución llevando a una rápida deshidratación debido a la incapacidad para ingerir agua. La

recuperación en casos leves usualmente demora varios días, pudiendo tener un curso bifásico. Los primeros signos, debido a la ingestión de las toxinas, llevan también a cierto grado de parálisis intestinal por lo que las esporas ingeridas pasan a estado vegetativo produciendo toxinas, que son absorbidas, causando esto una segunda fase clínica a las 2 o 3 semanas.

La mortalidad en estos casos puede llegar a 95 %. En humanos, el botulismo puede generar signos hasta 5 años después de ocurrida la enfermedad aguda.

Enfermedad crónica

Estos casos fueron relacionados con la ingestión de muy poca cantidad de toxinas denominándolo Botulismo Visceral. Los primeros signos clínicos son la reducción en la producción láctea, indigestión (constipación alternada con diarrea) micción frecuente, deshidratación, edema, etc.

Diagnóstico

En animales con temperatura corporal normal o subnormal, el botulismo es la primera opción diagnóstica en casos de presencia de parálisis flácida; como diagnóstico diferencial debe considerarse intoxicación por plantas tóxicas, ingestión de micotoxinas, órganos fosforados, mordeduras de serpientes o hipocalcemia. Colas flácidas y orejas caídas pueden indicar intoxicación aguda, aunque no son específicos, debiendo ser evaluado cualquier cambio que se haya realizado en la alimentación. Excepto por los casos de intoxicación clásica donde se observa parálisis de los miembros y lengua, el resto de los casos deben ser enviados a necropsia y análisis toxicológico e histopatológico. El tratamiento generalmente no es efectivo y el desencadenamiento de los sucesos no varía a pesar de que se haga el diagnóstico temprano.

Pruebas de laboratorio

Varios ejemplares deben ser examinados para confirmar el diagnóstico. La detección de la BoNT se realiza, principalmente, mediante la utilización de animales de laboratorio, con una metodología similar a la utilizada para la detección de TeNT. Se inoculan con la toxina dos grupos de animales, dándole a uno solo de ellos la antitoxina, luego son evaluados mediante signos clínicos por 96 horas. Existen otros métodos diagnósticos como ELISA, análisis de flujo lateral, PCR o qPCR pero todos ellos tienen contraindicaciones, dificultad para procesar la muestra o falta de sensibilidad o cuantificación de toxina.

Tratamiento y prevención

Como se mencionó, el tratamiento suele no ser efectivo luego de la aparición de signos clínicos. Tratamiento de soporte puede iniciarse previo al diagnóstico final y puede durar entre 4 a 6 semanas. Al igual que con el tétanos, la antitoxina no detiene los signos clínicos, ya que se neutraliza solamente la toxina circulante sin afectar a la que ya se encuentra en el sitio de acción. El tratamiento con la antitoxina es recomendado y la protección puede durar por al menos 3 semanas, teniendo la consideración que en algunos casos puede causar reacciones de tipo alérgicas.

Tabla 2. Muestras para diagnóstico de botulismo en laboratorio.

Animales vivos	Cadáveres	Muestras de suelo
Sangre/suero	Sangre/suero	Alimento (silo y ración final)
Contenido Ruminal	Contenido de todo el TGI	Suelo
Materia Fecal	Hígado	Agua
Saliva	Bazo	Carroña
	Tonsilas	

Pro-bióticos y pre-bióticos pueden impactar de manera benéfica sobre la microbiota intestinal en casos de botulismo crónico. La prevención clásica se basa en la reducción del número de esporos y formas vegetativas de *C. botulinum*. En el caso de los silos es importante tener en cuenta que cuando tiene un pH mayor a 5,5 y crecimiento de hongos no debe ser dado como alimento. Las carcasas deben ser retiradas de las áreas de pasturas o alimentación de aves.

Prevención e inmunidad

La vacunación contra botulismo está indicada solamente en áreas de alta prevalencia de la enfermedad. Las formulaciones de “larga acción” requieren una sola inyección cada 2 a 3 años. Siendo necesario una revacunación dos veces al año en lugares donde la enfermedad crónica sistémica es un problema.

La vacuna de toxoide de BoNT suele utilizarse rutinariamente en individuos con riesgo de exposición a la enfermedad, como trabajadores de la salud, investigadores y personal militar. Las primeras vacunas fueron desarrolladas inactivando la toxina mediante soluciones formoladas, al igual que la del tétano, logrando de esta manera una vacuna pentavalente (ABCDE). Debido a que cuando se generan anticuerpos en respuesta a la terapia contra

BoNT/A, la mayor parte de los epítopes de inmunidad están localizados en la cadena pesada(HC), en la actualidad existen vacunas recombinantes de la subunidad HCR.

La protección mediada por anticuerpos contra las BoNTs funciona mediante tres mecanismos diferentes. En el primero de ellos, se genera inmunoglobulina A (IgA) en la superficie de las mucosas digestivas previniendo la internalización de la toxina a través del intestino y por consiguiente impidiendo su llegada a la circulación sanguínea o linfática. En el segundo mecanismo, las inmunoglobulinas IgA e IgG se unen a las toxinas circulantes y las “marcan” para que puedan ser eliminadas por las células fagocíticas del sistema inmune. Por último, el tercer mecanismo se basa en anticuerpos específicos que se unen en la vecindad del sitio de unión de los receptores y bloquean la interacción de la toxina con el receptor neuronal. Sumado a esto, anticuerpos neutralizantes se unen a la cadena liviana de BoNT/A, causando, potencialmente, la inhibición de la translocación de la cadena liviana (LC).

Referencias

- Akbulut D, Grant KA, McLauchlin J. Improvement in laboratory diagnosis of wound botulism and tetanus among injecting illicit-drug user by real time PCR assay for neurotoxins gene fragment. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 4342-48.
- Becker WM, Kleinsmith LJ, Hardu J. 2007. *El mundo de la célula.* 6th edición. Madrid, Pearson Addison Wesley.
- Blum FC, Tepp WH, Johnson EA, Barbieri JT. Multiple domains of tetanus toxin direct entry into primary neurons. *Traffic.* 2014; 15(10): 1057-65. doi:10.1111/tra.12197.
- Böhnel H, Gessler F. Botulinum toxins-cause of botulinum and systemic diseases? *Vet Res Commun.* 2005; 29:269-73.
- Böhnel H, Gessler F. Neurotoxicogenic Clostridia. 2010. En: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, 4th ed. Ames, Blackwell Publishing, pp 189-202.
- Chen C, Baldwin MR, Barbieri JT. Molecular basis for tetanus toxins co-receptor interactions. *Biochemistry.* 2008; 47:7179-86.
- Mazzocchio R, Caleo M. More than at the neuromuscular synapse: actions of botulinum neurotoxin A in the central nervous system. *Neuroscientist.* 2015;21(1):44-61. doi: 10.1177/1073858414524633.
- Rossetto O, Pirazzini M, Montecucco C. *Botulinum* neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nature Rev Microbiol.* 2014; published online; doi:10.1038/nrmicro3295.
- Popoff MR, Bouvet P. Clostridial toxins. *Future Microbiol.* 2009; 4(8):1021-64.
- Popoff MR. Clostridial pore-forming toxins: Powerful virulence factors. *Anaerobe.* 2014; 30: 220-38.
- Restani L, Giribaldi F, Manich M, Bercsenyi K, Menendez G, Rossetto O, Caleo M, Schiavo G. Botulinum Neurotoxins A and E Undergo Retrograde Axonal Transport in Primary Motor Neurons. *PLoS Pathog.* 2012; 8(12): e1003087. doi:10.1371/journal.ppat.1003087
- Cook, T.M., R.T. Protheroe, and J.M. Handel. Tetanus a review of the literature. *Brit J. Anaesth.* 2001; 87:477-87.
- Przedpelski A, Tepp W, Kroken, Fu F, Kim J, Johnson E, Barbieri J. Enhancing the Protective Immune Response against Botulism. *Infect Immun.* 2013; 81:2638-44.
- Simpson LL. Identification of the major steps in botulinum toxin action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2004; 44:167-93.

CAPÍTULO 7

ETEC

Fabiana A. Moredo

Escherichia coli es uno de los principales habitantes del tracto intestinal del hombre y de la mayoría de las especies animales. Principalmente, se encuentra en intestino grueso y constituye aproximadamente el 0,1 % de la microbiota intestinal de animales de sangre caliente. Se caracteriza por ser un grupo de bacterias genéticamente heterogéneo, cuyos miembros en general son no-patógenos. Sin embargo, una pequeña proporción causa importantes enfermedades de distribución mundial, tanto para el hombre como para los animales. Estas cepas potencialmente patógenas se clasifican en categorías en función de los factores de virulencia que presentan y de la manifestación clínica que ellas causan: Enterotoxigénico (ETEC); Productor de toxina Shiga (STEC), los cuales también pueden ser denominados como productores de citotoxicidad en células Vero (VTEC); Enteropatógeno (EPEC); Enteroinvasivo (EIEC); Enteroagregativo (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC)

Las infecciones producidas por *E. coli* patogénicos, pueden limitarse a las superficies mucosas o diseminarse a través del organismo. Como consecuencia de esto, se identifican tres síndromes clínicos diferentes: a) infecciones del tracto urinario, b) sepsis/meningitis y c) diarreas. La diversidad patogénica de estas bacterias, en individuos aparentemente sanos, se atribuye a la posesión de una gran variedad de factores de virulencia.

Se define como ETEC, aquellas cepas de *E. coli* que al menos elaboran una de las toxinas pertenecientes a los grupos de entero-toxinas denominados termolábil (LT) y termoestable (ST). En principio, se asociaron a diarreas de lechones que podían ocasionar la muerte de neonatos. Los primeros estudios realizados pusieron en evidencia el mecanismo de la enfermedad, incluyendo la existencia de dos plásmidos que codifican la producción de las toxinas. Posteriormente, se observó que también pueden ocasionar diarrea en niños y adultos.

Entre las diversas categorías, ETEC es la principal causa de diarrea en humanos; reconocida como una de las etiologías más frecuentes (a veces fatal) de diarrea infantil en países en vía de desarrollo y diarrea del viajero. En medicina veterinaria, se asocia a diarrea acuosa severa en terneros recién nacidos y lechones lactantes y destetados; es raro o inexistente en otras especies animales de granja como conejos, caballos o aves de corral, para

lo cual en la actualidad no hay una explicación, ya que estos animales parecen tener receptores y ser sensibles a las entero-toxinas y a las adhesinas de algunos ETEC.

Taxonomía

De acuerdo con la novena edición del Manual Bergey de Bacteriología Sistemática, *Escherichia coli* pertenece al orden Eubacteriales, familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichiae*, género *Escherichia*. Si bien la especie tipo es *E. coli*, el género está integrado por cinco especies: *E. coli*, *E. hermannii*, *E. fergusonii*, *E. vulneris* y *E. blattae*.

Características generales

Morfológicas y tintoriales

Morfológicamente, se caracterizan por ser bacilos rectos y cilíndricos de 1,1-1,5 por 2-6 μm , que se presentan solos o de a pares. Son gramnegativos, móviles debido a la presencia de flagelos peritricos. El filamento flagelar mide alrededor de 20 nm de diámetro y puede alcanzar más de 20 μm de longitud. Consiste en subunidades de una única proteína, flagelina, la cual está codificada en el gen *fliC*. La mayoría de las cepas de *E. coli* tiene sólo un gen el cual no es sometido a variación de fase.

Otro tipo de estructura accesoria presentes en *E. coli* son las fimbrias, cuya principal función está asociada a la adhesión a tejidos del hospedador y a compuestos circulantes, importante característica de este microorganismo que se ve reflejada en el elevado número de tipos de adhesinas y sus altos niveles de expresión sobre la superficie bacteriana. La capacidad de adhesión es importante en el tropismo de tejidos, en el proceso de colonización bacteriana y ayuda a *E. coli* a resistir los mecanismos de defensa del hospedador como el peristaltismo o la micción.

Estructura antigénica

La clasificación serológica se realiza según el esquema modificado de Kauffman, en base a los antígenos O (cadena lateral O del lipopolisacárido de membrana externa, alrededor de 200 serotipos), antígeno H (flagelar, 56 serotipos), antígeno F (fimbrial, más de 22 serotipos) y antígeno K (polisacárido capsular, cerca de 60 serotipos).

Factores de virulencia

Como otros patógenos localizados en mucosas, *E. coli* debe seguir la siguiente estrategia de infección: a) colonización de la mucosa, b) evasión de los mecanismos de defensa del

hospedador, c) multiplicación y d) daño en el hospedador. Una de las características más conservadas de *E. coli* diarreigénicos, es su habilidad para colonizar la superficie intestinal a pesar del peristaltismo y la competencia nutricional con la microbiota nativa del intestino, incluyendo otras cepas de *E. coli*.

Cualquiera sea la categoría de *E. coli*, la habilidad para adherirse a las células epiteliales es un factor esencial en el proceso de colonización de las células hospedadoras y en el futuro desarrollo del proceso infeccioso. Se demostró que la adhesión cumple otras funciones importantes en los estadios posteriores del proceso infeccioso; por ejemplo, durante la formación de reservorios bacterianos intracelulares para posteriores ciclos de infección, inducción de la señalización celular e inducción de la respuesta inmune innata. La aclaración de los aspectos moleculares del proceso por el cual *E. coli* se adhiere e ingresa a las células epiteliales podría dar lugar al desarrollo de estrategias efectivas para prevenir la emergencia y recurrencia de la infección.

ETEC es considerado como el prototipo patogénico: las bacterias colonizan la superficie de la mucosa del intestino delgado y posteriormente elaboran una o ambas entero-toxinas sin ocasionar lesión aparente.

Enterotoxinas producidas por ETEC

Las entero-toxinas son proteínas o péptidos que tienen acción en el intestino y son producidos por microorganismos patógenos. La primera entero-toxina de ETEC fue descrita en 1967 por Smith y Halls cuando observaron acumulación de fluidos en asa intestinal ligada inoculada con el sobrenadante termoestable realizado a partir de *E. coli* de origen porcino. Poco tiempo después se identificó la toxina termolábil, antigénicamente relacionada con la toxina del cólera. En humanos, cerca del 46 % de ETEC aislados expresan solo toxinas ST, 25 % solo LT y 49 % ambos tipos de toxinas.

Las toxinas están codificados en plásmidos y estas características de virulencia pueden ser transferidas entre cepas de *E. coli*.

Toxina termo-lábil (LT)

LTs de ETEC son toxinas estrechamente relacionadas en estructura y función con la enterotoxina colérica producida por *Vibrio cholerae*. Hay dos grandes serogrupos de LT, LT-I y LT-II los cuales no presentan inmunidad cruzada. LT-I es producida por cepas de *E. coli* patógenas para humanos y animales. LT-II se encontró en aislamientos de origen animal y escasamente en humanos, en ninguno de los dos casos se asoció con procesos infecciosos.

In vitro, LT promueve la adherencia de ETEC a los enterocitos; mientras que todos los aislamientos de ETEC tienen el potencial de producir diarrea, aquellos que expresan LT presentan ventajas en términos de colonización.

- **LT-I.** Es una toxina oligomérica de 86 kDa, compuesta por una subunidad A y cinco subunidades B idénticas. Las subunidades B están agrupadas en forma de anillo y se unen estrechamente al gangliósido G_{M1} y débilmente al G_{D1b} y a algunas glicoproteínas intestinales. La subunidad A es la responsable de la actividad enzimática de la toxina y está proteolíticamente dividida en los péptidos A_1 y A_2 unidos por puentes disulfuro. El péptido A_1 tiene actividad ADP-ribosil-transferasa y actúa transfiriendo la mitad de un ADP-ribosil del NAD a la subunidad alfa de la proteína GTP ($G_{S\alpha}$), estimulando la actividad de la adenilato ciclasa. La ADP-ribosilación de la subunidad $G_{S\alpha}$ produce una activación permanente de la adenilato ciclasa, incrementando los niveles de AMP cíclico intracelular (cAMP). El incremento de estos niveles en la célula hospedadora, abre diferentes canales, incluyendo el receptor trans-membrana fibrosis quística, ocasionando la pérdida de fluidos y electrolitos en el lumen intestinal.
- **LT-II.** El serogrupo LT-II también incrementa los niveles intracelulares de cAMP utilizando mecanismos similares a LT-I. Se diferencia en que LT-II en lugar de utilizar como receptores a G_{M1} , lo hace con G_{D1} . Como se mencionó, no existen evidencias que relacionen a LT-II con enfermedades de humanos y animales.

Toxinas termo-estables (ST)

Las enterotoxinas termoestables, son pequeños péptidos secretados por bacterias enterotoxigénicas. Los péptidos termoestables son activos aún luego de exponerlos a 100 °C durante 15 minutos, producidos por *E. coli* y otros patógenos como *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* O1, *Vibriomimicus*, *Citrobacterfreundii* y *Klebsiellapneumoniae*.

En ETEC se describieron tres tipos de STs: STa, STb y EAST1 (toxina termoestable enteroagregativa 1).

Se identificaron dos familias de enterotoxinas termo-estables (STs) que difieren tanto en estructura como en función: STa y EAST1 con sitio de unión en el receptor guanilato ciclasa C y STb que no tiene como sitio de unión GC-C y actúa incrementando los niveles intracelulares de Ca^{++} .

Guanilato ciclasa C, es el único receptor identificado para STa, perteneciente a la familia de receptores guanilato ciclasa que catalizan, tras su activación, la conversión de GTP en cGMP. GC-C presenta la estructura de dominio conservado, incluyendo dominio de unión extracelular, un dominio simple trans-membrana, un dominio intracelular homólogo a una quinasa y un dominio catalítico que produce cGMP. GC-C se expresa principalmente en las células de la mucosa intestinal desde el duodeno hasta el recto, ubicado en la porción apical de los enterocitos tanto de las vellosidades como de las criptas.

La activación de GC-C estimula el incremento del GMPc intracelular, el cual se une y activa sus tres efectores: proteína quinasa GMPc dependiente (PKGs), fosfodiesterasas (PDEs) y canales cerrados de nucleótidos cíclicos (CNG). Altas concentraciones de cGMP intracelular, también pueden activar una proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA). PKGs son los principales mediadores intracelulares para la señalización de GMPc.

La entero-toxina termoestable STb, se asocia principalmente a cepas ETEC de origen porcino, aunque también se encontró en aislamientos humanos y de otras especies animales (pollos, bovinos, caninos, hurones y marmotas). STb induce daños histológicos en el epitelio intestinal, como pérdida de vellosidades y atrofia parcial de las mismas. STb reconoce como su receptor a un glicofingolípido llamado sulfátido. Esta molécula está presente en el epitelio intestinal de cerdos y humanos. Para estimular la secreción de fluidos, la toxina debe estar internalizada. Una vez dentro de la célula hospedadora, se estimula una proteína reguladora de unión a GTP, ocasionando la entrada de calcio a través de la activación del canal de calcio cerrado receptor-dependiente, por una proteína quinasa II-calmodulina dependiente, lo que activa la apertura de un canal intestinal de iones y puede también activar una proteína quinasa C y consecuentemente CFTR. Los niveles incrementados de calcio regulan la actividad de las fosfolipasas A y C y la liberación del ácido araquidónico desde los fosfolípidos de membrana conduciendo a la formación de prostaglandina E₂ (PGE₂) y 5-HT que median el transporte de agua y electrolitos fuera de las células intestinales. STb estimula la secreción de bicarbonato desde los enterocitos, lo que provoca su acumulación, junto con el aumento de la concentración de Na⁺ y Cl⁻ en el lumen intestinal. STb altera la longitud de las vellosidades en el yeyuno porcino pero no afecta la profundidad de las criptas, reduce marcadamente la tasa neta de absorción de fluidos. La exposición del yeyuno porcino a la toxina, induce alteraciones estructurales microscópicas de la mucosa intestinal, incluyendo el acortamiento de las vellosidades (una reducción del 11 - 19 %, pérdida de las células de absorción de las vellosidades y atrofia parcial), un incremento de las células epiteliales descamadas en el lumen y cambios en el epitelio, que pasa de columnar a cuboidal, en los extremos de las vellosidades más cortas consecuente con la capacidad de absorción comprometida. STb induce la formación de poros en vesículas del ribete en cepillo del yeyuno porcino lo que podría explicar la secreción de electrolitos observada en la colibacilosis ocasionada por STb. Los poros formados no son específicos, permitiendo el pasaje de aniones y cationes. Como otras toxinas formadoras de poros pueden matar células eucariotas, STb podría ser responsable de la muerte celular dando por resultado las alteraciones observadas en el epitelio intestinal (Figura 1).

Factores de colonización

Las fimbrias son apéndices superficiales en forma de bastoncillo que median la unión a los tejidos del hospedador. Cada unidad consta de cientos de copias de una subunidad principal que proporciona la estructura y confiere la especificidad antigénica de las fimbrias. Las fimbrias también pueden contener varias copias de subunidades menores, una de las cuales puede ser una adhesina con propiedades de unión específicas. La nomenclatura no se encuentra estandarizada y se nombraron en base a criterios tales como la cepa de origen (F41, 987P, F107), la estructura supuesta (K88, K99) y la función putativa (antígeno del factor de colonización [CFA]). Se diseñó un sistema de letras F para designar adhesinas fimbriales de la

misma manera que los antígenos O y K y tanto esta nomenclatura como las designaciones originales se usan en la literatura. Por lo tanto, las fimbrias originalmente llamadas K88, K99, 987P, Fy y F107 son sinónimos con F4, F5, F6, F17 y F18.

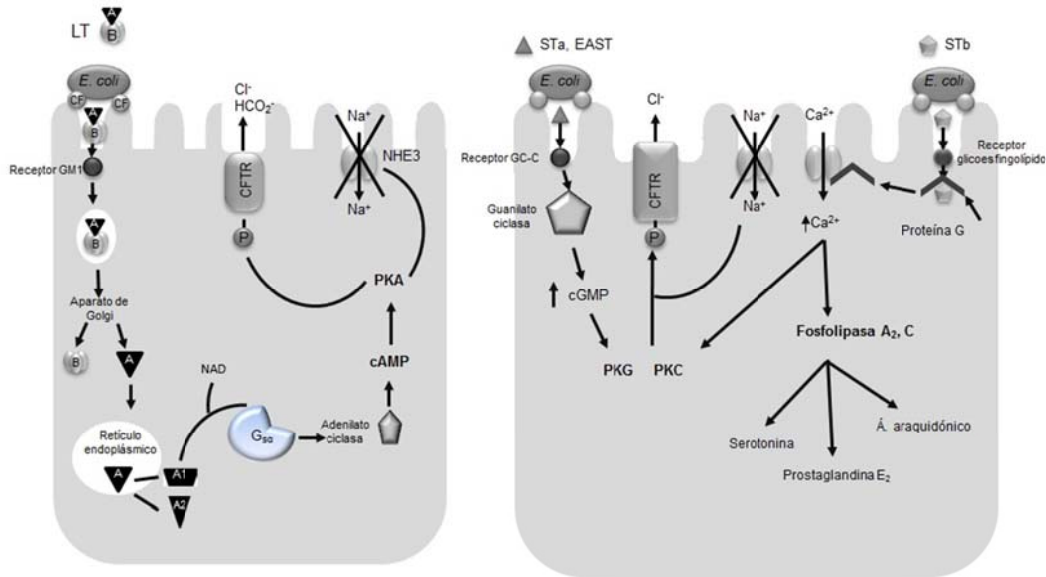


Figura 1. ETEC se une a los enterocitos del intestino delgado a través de factores de colonización (CFs). Las enterotoxinas termolábil (LT) y termoestables (STa), se secretan y producen diarrea a través de la activación del regulador transmembrana de fibrosis quística (CFTR) por cAMP, cGMP e incremento de los niveles intracelulares de Ca^{++} .

Los mecanismos por los cuales ETEC se adhieren y colonizan la mucosa intestinal, fueron objeto de numerosas investigaciones. Para producir diarrea, ETEC deben adherirse a los enterocitos del intestino delgado a través de sus fimbrias de superficie o adhesinas no fimbriales. Se caracterizaron una gran cantidad de antígenos fimbriales. La heterogeneidad antigénica conferida por la existencia de múltiples antígenos fimbriales es un obstáculo para el desarrollo de una vacuna efectiva. Las fimbrias le otorgan a ETEC cierta especificidad de especie: las productoras de F5 son patógenas para bovinos, ovinos y cerdos mientras que las que expresan F4 son capaces de producir enfermedad sólo en cerdos. Las cepas humanas de ETEC poseen su propio grupo de fimbrias de colonización, los CFA (*colonization factor antigens*). Los CFA se pueden dividir en función a sus características morfológicas. Existen tres variedades morfológicas importantes: bastones rígidos (CFA/I), bastones flexibles (CFA/III) y estructuras delgadas y flexibles (CFA/II y CFA/IV).

Los genes que codifican estas estructuras están localizados en plásmidos, que también transportan los genes para ST y/o LT.

Patogénesis

ETEC ingresa al hospedador por vía oral. Cuando está presente en cantidades suficientes coloniza el intestino delgado previa adhesión fimbrias-receptores del epitelio del intestino

delgado o en el mucus que lo recubre. ETEC proliferan rápidamente para alcanzar concentraciones de cercanas a 10^9 UFC/gramo de intestino en el yeyuno medio hasta el íleon. ETEC una vez adheridas producen entero-toxinas que estimulan la secreción de agua y electrolitos hacia la luz intestinal. Esto conduce a una diarrea si el exceso de fluido del intestino delgado no se absorbe en el intestino grueso, por lo cual, ocasiona diarrea acuosa severa, lo que puede llevar a deshidratación, apatía, acidosis metabólica y muerte.

En algunos casos, especialmente en los cerdos, la infección puede progresar tan rápidamente que la muerte ocurre antes del desarrollo de la diarrea y se conoce como colibacilosis entérica complicada con shock. Este fenómeno es probablemente debido a la rápida liberación de grandes cantidades de LPS. La porción de lípido A del LPS es principalmente responsable de los signos de shock. El LPS estimula la sobreproducción de mediadores de la inflamación, incluido el factor de necrosis tumoral (TNF) α , interleucina (IL)-1 e IL-6, que causan estos signos. Estos mediadores promueven el shock al hiperestimular el endotelio vascular lo que ocasiona una mayor permeabilidad. La agregación y degranulación posterior de neutrófilos activados por estos mediadores pueden causar daño al endotelio. La modulación de la vía de coagulación puede conducir a depósitos de fibrina y a la formación de coágulos.

Las infecciones entéricas por ETEC también pueden provocar septicemia secundaria y manifestaciones de ictericia, hemorragias petequiales en las membranas mucosas y esplenomegalia acompañada de diarrea intensa y deshidratación. En tales casos, ETEC puede pasar a través de la mucosa intestinal, probablemente por captación endocítica hacia las células epiteliales intestinales o a través de los espacios intercelulares entre las células epiteliales para ubicarse en los ganglios linfáticos mesentéricos antes de ingresar al torrente sanguíneo, lo que produce una infección generalizada con diseminación bacteriana.

ETEC en cerdos

Los lechones recién nacidos ingieren ETEC especialmente de las glándulas mamarias de la madre y de la jaula o corral de parto. Las bacterias se originan a partir de la materia fecal de lechones con diarrea por ETEC, lechones portadores asintomáticos o cerdas. Estos ETEC pertenecen a dos grupos principales: STa+/F5+ no hemolítica (similares a las que causan diarrea en terneros neonatos) y F4+ especialmente O149, que también están implicados en la diarrea pos-destete. Higiene deficiente, desinfección inadecuada, sistema de parto continuo, temperatura ambiente menor de 25 °C o corrientes de aire excesivas son factores ambientales asociados al desarrollo de la diarrea, ya que ocasionan una acumulación de *E. coli* patógenos en el medio ambiente o a una actividad peristáltica reducida y un retraso en el paso de bacterias y anticuerpos protectores a través del intestino.

En cerdos recién nacidos, el pH del estómago y el duodeno es menos ácido y la producción de enzimas digestivas es baja en comparación con los cerdos adultos, lo que proporciona un entorno favorable para la rápida multiplicación de bacterias como *E. coli*, incluida ETEC que

puede estar presente en el entorno del lechón. La diarrea se observa principalmente en los primeros días después del nacimiento y afecta a uno o más animales en un grupo. Se puede observar diarrea menos acuosa en los cerdos durante las primeras semanas de vida o 2 días después del destete, con baja mortalidad y a menudo, con disminución del aumento de peso. En los lechones afectados a menudo se observa co-infección con otros patógenos como el virus de gastroenteritis transmisibles, rotavirus o coccidios. Los aislamientos F4+ ocasionalmente proliferan rápidamente en el intestino delgado de cerdos jóvenes e inducen síntomas de shock y muerte rápida. La colibacilosis entérica complicada con shock ocurre en lechones destetados y recientemente destetados y se manifiesta como muerte rápida con cianosis cutánea de las extremidades o con hipertermia, diarrea y anorexia. La diarrea pos-destete se ve amarillenta o gris y comienza 3-5 días después del destete, durando hasta una semana y causando emaciación. Durante varios días, la mayoría de los cerdos de un grupo pueden verse afectados y se puede observar una mortalidad de hasta 25% en ausencia de tratamiento con antibióticos.

La dieta es uno de los factores más importantes que influyen en el curso de la enfermedad. Una dieta rica en productos lácteos y energía reduce la duración del período de disminución del consumo de alimento y la mortalidad asociada y retrasa la aparición de los signos clínicos. El plasma seco añadido a la alimentación también tiene un efecto protector en la reducción de la incidencia y la gravedad de la diarrea. Por el contrario, otros ingredientes del alimento, como la soja, parecen favorecer la ocurrencia de diarrea pos-destete. Esto podría deberse a la presencia de inhibidores de la tripsina o antígenos que inducen una respuesta del sistema inmune localizado. Esto último podría dar como resultado cambios como disminución de la altura de las vellosidades, profundización de las criptas y aumento de las inmunoglobulinas anti-soja en el suero, lo que posiblemente predisponga a la proliferación de *E. coli*.

En el medio ambiente, ETEC puede sobrevivir durante cerca de 6 meses si está protegido por la materia fecal, lo que facilita su propagación a otros cerdos. Las infecciones por otros patógenos, como el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) pueden provocar inmunosupresión, lo que permite que ETEC cause una septicemia que conduce a la muerte. La edad de destete puede ser un factor predisponente para el desarrollo de diarrea pos-destete, los cerdos destetados a la 2ª semana de vida o menos tienen el doble de probabilidades de desarrollar diarrea que los destetados a la 5ª semana.

En la histopatología, de cerdos recién nacidos y pos-destete con infección por ETEC, se observan capas de *E. coli* adheridos a la mucosa de yeyuno e íleon. Por lo general, no se observan lesiones microscópicas. ETEC coloniza las criptas de Lieberkühn y cubre el ápice de las vellosidades. En casos de colibacilosis entérica complicada por shock, se pueden observar lesiones microscópicas típicas de gastroenteritis hemorrágica, congestión y trombos fibrinosos microvasculares y necrosis de las vellosidades en la mucosa del estómago, el intestino delgado y el colon.

ETEC en bovinos y ovinos

En terneros y corderos, la diarrea se observa principalmente en los primeros días después del nacimiento. Los animales producen grandes cantidades de materia fecal pastosa, maloliente, acuosa, que varía de amarilla pálida a blanca y ocasionalmente contienen trazas de sangre. En casos agudos, la pérdida extensa de líquido conduce a una marcada disminución en el peso corporal dentro de las 6 a 8 horas del inicio de la diarrea. La mucosa intestinal por lo general parece normal en la histopatología.

Los virotipos de ETEC más comúnmente asociados con la diarrea en terneros y corderos son STa:F5:F41 y STa:F41 y los serogrupos O 8,9,20,64 y 101. Estos ETEC a menudo producen antígeno K (polisacárido ácido) como K25, K28, K30 o K35, lo que puede mejorar la colonización intestinal iniciada por adhesinas fibrilares. ETEC en terneros y corderos típicamente produce solo enterotoxina STa y adhesinas fimbriales F5 (K99) y F41. Estos ETEC inducen diarrea en terneros solo hasta algunos días de edad. Los terneros mayores son más resistentes y las infecciones en animales mayores de 3 días de vida, generalmente se asocia a rotavirus y otras infecciones virales.

Al igual que lo mencionado en cerdos, la acidez gástrica reducida en los terneros recién nacidos aumenta la susceptibilidad de los animales a la infección por ETEC. Además, el pH gástrico aumenta sustancialmente después de alimentar a los terneros con sustituto lácteo. Otras adhesinas fimbriales como F17, se expresan con menos y su importancia en la unión de ETEC a enterocitos es menos clara. Sin embargo, *E. coli* F17+ que produce el CNF2 puede inducir diarrea en terneros recién nacidos y privados de calostro, pudiendo estar involucrado en el desarrollo de diarrea en terneros mantenidos en condiciones convencionales.

Respuesta inmune

Inmunidad innata

Las infecciones por ETEC estimulan la producción de citoquinas pro-inflamatorias, incluida la interleucina 8, potente quimiotáctico para leucocitos polimorfonucleares. El aumento de los niveles fecales de IL-8 se asoció con una resolución más rápida de las infecciones por ETEC, lo que sugiere que es relevante para promover la eliminación de estos microorganismos en el intestino delgado. El aumento del cAMP inducido por LT, inhibe la síntesis de varias citoquinas, incluidas el TNF- α e IL-8, así como péptidos antimicrobianos intestinales al interferir con el NF- κ B, factor de transcripción de la vía de señalización TLR.

Inmunidad adaptativa

La inmunidad protectora contra las infecciones entéricas por *E. coli* se basa en la presencia de anticuerpos antiadherentes contra antígenos de superficie. Los más estudiados son los anticuerpos anti-fimbrias presentes en el calostro y leche de madres vacunadas; son

protectores cuando alcanzan cantidad suficiente en el intestino de lechones o terneros lactantes. Los anticuerpos contra la cápsula de polisacáridos de ETEC también pueden ser protectores. Tanto los anticuerpos anti-fimbrias como los anti-cápsula evitan la adhesión de ETEC a los enterocitos.

Múltiples estudios demostraron que la manifestación clínica de la enfermedad disminuye con la edad de los individuos afectados por ETEC, ya que las infecciones de origen natural proporcionan protección contra los episodios posteriores. La mayoría de los estudios de respuesta inmune a ETEC se centraron en las respuestas a CF y LT. Sin embargo, la naturaleza precisa de los antígenos protectores luego de las infecciones por ETEC no es muy clara. Aunque algunos estudios sugirieron que la infección con cepas que expresan un CF particular es protectora contra la infección posterior con cepas que expresan CF homólogas, otros estudios no demostraron esta asociación. Investigaciones recientes de inmunoproteómica, muestran que la respuesta inmune a ETEC es extraordinariamente compleja e implica el reconocimiento de múltiples antígenos además de LT y CF, incluyendo antígenos descubiertos más recientemente como la adhesina EtpA.

Profilaxis

En general, las infecciones neonatales pueden prevenirse eficazmente mediante la inmunidad pasiva calostrada y lactogénica obtenida mediante la vacunación de las cerdas. En este sentido, varias vacunas maternas están en el mercado. Estas se aplican principalmente por vía parenteral a las cerdas gestantes. Sin embargo, al destete, la protección lactogénica desaparece. Las cepas involucradas en la diarrea pos-destete expresan principalmente fimbrias F4 o F18. En consecuencia, se requiere una inmunidad activa en la mucosa intestinal, en la cual la producción local de IgA específica para F4 y/o F18 desempeña un papel importante para proteger a los cerdos contra la diarrea pos-destete.

Además, en todo aquello concerniente a la inmunoprofilaxis, es importante permitir que la cría de mamíferos reciba la dosis de calostro adecuada, mantener la higiene del entorno y evitar altas densidades poblacionales.

Bibliografía

- Bolton DJ, Duffy G, Baylis CL, Tozzoli R, Morabito S, Wasteson Y, Lofdahl S. Pathogenicity, virulence and emerging pathogenic *Escherichia coli*. Pathogenic *Escherichia coli* Network 2006
- Bolton DJ. Verocytotoxigenic (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli*: virulence factors and pathogenicity in the farm to fork paradigm. *Foodborne Pathog Dis* 2011; 8:357-65.
- Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Rev Microbiol* 2010; 8:26-38.
- Dubreuil JD. *Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: knowing is half the battle. *FEMS Microbiol Lett* 2008; 278: 137-145.
- Dubreuil JD. STb and AIDA-I: The missing link? *Crit Rev Microbiol* 2010; 36: 212-220.
- Dubreuil JD. Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC). *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2014; 728-34.
- Fairbrother JM, Nadeau E, Gyles CL. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis and prevention strategies. *Anim Health Res Rev* 2005; 6:17-39.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Enterobacteriaceae*. En: *Diagnóstico Microbiológico*. 5ta Edición. Buenos Aires, Argentina, Ed Panamericana, 1999, p. 171-250.
- Melkebeeka V, Goddeerisa BM, Coxa E. ETEC vaccination in pigs. *Vet Immunol Immunopathol*. 2013; 152:37-42.
- Nagy B, Fekete PZ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* 2005; 295:443-54.
- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:142-201.
- Parma AE, Sanz ME, Blanco JE, Blanco J, Viñas MR, Blanco M, Padola NL, Etcheverría AL. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. Importance in public health. *Eur J Epidemiol* 2000; 16:757-62.
- Scheutz F, Strockbine NA. Genus I. *Escherichia*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2^oed. 2005. Springer. USA p 607-24.

CAPÍTULO 8

Estafilococos

Nestor Oscar Stanchi

Dentro de los patógenos que afectan a los animales y al hombre, los estafilococos ocupan un lugar preponderante. Los estafilococos son bacterias grampositivas de forma esférica con diámetro entre 0,5 y 1,5 μm . En frotis directo suele observarse los como cocos aislados o de a pares, mientras que en tinciones a partir de cultivos su agrupación es en racimos. Se conocen más de 50 especies y subespecies y constantemente se descubren nuevas o se re clasifican las existentes.

Características de la bacteria

La taxonomía de los microorganismos está en constante revisión. Dentro de la clase Bacilli, orden Bacillales y familia *Staphylococcaceae*, se encuentran los microorganismos pertenecientes a 4 géneros: *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Jeotgalicoccus* y *Salinicoccus*. *Staphylococcus aureus* es un patógeno que, en muchas ocasiones, es considerado como comensal oportunista. Posee una batería de mecanismos de acción patógena que permite vencer las defensas orgánicas ya que puede causar infecciones de piel, enterotoxemia e infecciones septicémicas, además es importante como causa de síndrome de shock tóxico. *S. aureus* es un patógeno de importancia en medicina veterinaria ya que causa enfermedades en prácticamente todas las especies animales. Presenta la particularidad de generar resistencia a los antimicrobianos lo que lo hace un microorganismo de alto riesgo para la salud, constituyendo un problema clínico y epidemiológico principalmente en los hospitales de humana. Al parecer, los animales que presentan microorganismos resistentes fueron infectados por humanos.

Origen de las infecciones

Los estafilococos están íntimamente asociados con la piel y fosas nasales del hombre y de los animales. La transmisión puede ser directa o indirecta, a través de materiales de jaulas, establos, pelos y alimentos.

Factores de virulencia de *Staphylococcus*

Se describieron varios factores de virulencia importantes en las infecciones estafilocócicas. La mayoría de ellos se estudiaron en *S. aureus*, aunque también se encontraron en otras especies de *Staphylococcus*.

Estos factores de virulencia pueden dividirse en exotoxinas, exo-enzimas, proteínas y componentes asociados de la superficie celular. Uno de los aspectos importantes de *S. aureus* es que, en respuesta a un cambio en el hospedador, puede activar una serie de genes para mejorar sus posibilidades de supervivencia. La regulación de la producción de factores de virulencia en respuesta a señales ambientales, densidad celular y la disponibilidad de energía se logra mediante un complejo sistema de regulación (sistemas de dos componentes y factores de transcripción). El más importante y mejor descrito es el sistema de dos componentes que está codificado por el regulador del gen accesorio (*agr*) (Tabla 1).

Componentes asociados a la superficie celular

Proteína A

Staphylococcus aureus posee una proteína de superficie llamada proteína A que posee la característica de unirse a moléculas de IgG por su región de Fc. Esto significa que las inmunoglobulinas se unen al antígeno (*S. aureus*) en la orientación incorrecta, lo que impide la opsonización y su posterior fagocitosis.

Adhesinas

Los estafilococos pueden expresar proteínas en su superficie que promueven la fijación a proteínas del hospedador, como fibronectina, laminina, vitronectina y colágeno, que forman la matriz extracelular de las superficies epiteliales y endoteliales. Además, algunas cepas expresan una proteína de unión a fibrinógeno (factor de aglutinación), que es responsable de la fijación a coágulos sanguíneos y a tejidos traumatizados. La interacción con el colágeno también puede ser importante en la facilitación de la fijación bacteriana al tejido dañado, donde han sufrido las capas subyacentes.

Estas proteínas u otros componentes de la superficie microbiana se sugieren como responsable de la formación de *biofilms*.

Polisacárido capsular

Se identificaron 11 tipos de cápsula, representando serológicamente a distintos *S. aureus* de origen humano y animal. Estos polisacáridos capsulares se propusieron como responsables de interferir en los mecanismos de defensa del hospedador inhibiendo la fijación de anticuerpos. También se describieron como modo de unión a las células epiteliales, endoteliales y monocitos e inducen la liberación de citoquinas.

Tabla 1. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*.

Factor de Virulencia		Función
Factores de la superficie celular		
Componentes de superficies que se adhieren a moléculas	Proteína A (SpA)	Se pega a la IgG interfiriendo la opsonización y fagocitosis
	Fibronectina	Se pega a la fibronectina
	Proteína de adhesión al colágeno	Adherencia al colágeno y al cartílago
	Proteínas de coagulación	Mediante la coagulación y la adherencia al fibrinógenos en presencia de fibronectina
	Polisacárido capsular	Reduce la fagocitosis de los neutrófilos y aumenta la colonización bacteriana y persistencia en la mayoría de las superficies mucosas.
	Estafiloxantina	Resistencia a la reacción basada en oxidación de la fagocitosis neutrofílica
Factores secretados		
Superantígenos	Enterotoxinas (SEA, B, C, D, E, G and Q)	Activación masiva de las células T
	Toxina 1 del síndrome de shock tóxico (TSST-1)	Activación masiva de las células T
Toxinas citolíticas	Citolisinas	
	α -hemolisina	Induce la lisis de un amplio espectro de células, principalmente plaquetas y monocitos.
	β -hemolisina	Hidroliza la esfingomielina de la membrana plasmática de los monocitos, eritrocitos, neutrófilos y linfocitos, haciéndolos susceptibles a otros agentes líticos.

	γ- hemolisina	Induce la lisis de eritrocitos y leucocitos.
	Leucocidinas E/D y M/F-PV	Induce lisis en leucocitos
	Leucocidina o factor de Panton-Valentine (PVL)	Induce lisis en leucocitos
Exoenzimas		
	Coagulasa	Coagula el plasma
	Lipasas	Inactiva los ácidos grasos
	Nucleasas	Hidroliza los ácidos nucleicos
	Proteasas	Destruye proteínas
	Serina (toxina exfoliativa ETA y ETB)	Inactiva la actividad de los neutrófilos
	Cisteína	Bloquea a los neutrófilos
	Aureolisina	Inactiva los péptidos antimicrobianos
	Estafiloquinasa (SAK)	Hialuronidasa. Degrada péptidos con actividad antimicrobiana
Proteínas varias		
	Inhibidor del complemento (SCIN)	Inhibe la activación del complemento
	Extracellular fibrinogen binding protein (Efb)	Inhibe la activación del complemento
	Proteína inhibitoria de la quimiotaxis (CHIPS)	Inhibe la quimiotaxis y la activación de los neutrófilos
	Formyl peptido semejante a la proteína inhibitoria 1 (FLIPr)	Inhibe la quimiotaxis de los neutrófilos
	Proteína de adherencia extracelular (Eap)	Inhibe la migración de los neutrófilos

Factores secretados

Superantígenos

Enterotoxinas y toxina del síndrome shock tóxico

Staphylococcus aureus secreta una entero-toxina conocida como toxina TSS (del inglés *Toxic Shock Syndrome*) (TSST-1), que tiene capacidad de super-antígeno, estimula las células T sin un reconocimiento antigénico normal. Esto produce una fuerte estimulación de las células T, que responden con proliferación y liberación masiva de citoquinas. De esta manera, se activan hasta un 25 % de todas las células, mientras que los antígenos convencionales sólo estimulan alrededor 0,001 %. Las citoquinas liberadas en grandes cantidades causan los síntomas del Síndrome de Shock Tóxico (TSS).

Hasta el momento, en *S. aureus*, se identificaron nueve entero-toxinas, las que desempeñan un papel preponderante en el ser humano pero también en bovinos, caprinos y ovinos. En perros, se describieron entero-toxinas producidas por *S. pseudintermedius* las que producen diarrea y vómitos cuando ingresan al animal por vía digestiva. La TSST-1 se libera en el torrente sanguíneo y es la causa del síndrome de shock tóxico. Las enterotoxinas pueden también causar TSS si entran en la circulación como secuela de alguna infección estafilocócica si una enterotoxina o TSST-1 se libera en forma sistémica y el hospedador carece de anticuerpos neutralizantes apropiados.

Toxinas citolíticas

Hemolisinas α , β , y leucocidina

La α -toxina es la más potente y mejor caracterizada con actividad de daño de membrana de las células susceptibles como plaquetas y monocitos de origen humano. Estas células tienen un receptor específico para α -toxina permitiendo que se una, produciendo pequeños poros a través de los cual pueden pasar cationes. Después de pegarse la toxina, ocurre una compleja serie de reacciones secundarias, con liberación de citoquinas y activación de la producción de mediadores inflamatorios. Estos acontecimientos causan los síntomas de shock séptico que ocurren durante las infecciones graves por *S. aureus*.

La β -toxina es una esfingomielinasa que daña las membranas ricas en este lípido. La clásica prueba de β -hemólisis es la lisis completa de los eritrocitos ovinos. Esta hemolisina permite el reconocimiento sencillo de la mayoría de las cepas de *S. aureus* y de prácticamente todas cepas de *S. pseudintermedius* de caninos en agar sangre ovina. Sin embargo, el papel patógeno de esta toxina es desconocido.

La γ -toxina (también llamada leucotoxina) y la leucocidina son proteínas que actúan en conjunto para dañar membranas lipídicas de los leucocitos. Algunos aislamientos de *S. aureus* expresan leucocidina, pero casi el 90 % de las cepas proveniente de lesiones dermonecroticas severas y de neumonía necrótica producen esta toxina, sugiriendo que es un factor importante de necrosis en las infecciones.

La δ -toxina es un péptido muy pequeño, producido por la mayoría de las cepas de *S. aureus* siendo desconocido su papel en la enfermedad. Se sabe que tiene efectos directos e indirectos en la actividad de neutrófilos y monocitos y así tiene capacidad pro-inflamatoria.

Toxina de Pantón-Valentine (PVL)

Existe una asociación epidemiológica entre cepas genéticamente diversas de *S. aureus* que llevan los genes PVL y la neumonía necrotizante fatal. Si bien la toxina (leucocidina) de Pantón-Valentine por sí sola no es una sustancia muy tóxica, produce granulocitopenia seguida de granulocitosis marcada pero no letal. Además existe una fuerte relación epidemiológica entre cepas de *S. aureus* y la toxina de Pantón-Valentine en las infecciones cutáneas primarias profundas.

Exoenzimas

- **Coagulasa**

La coagulasa es una proteína extracelular que se une a la protrombina en el hospedador para formar un complejo llamado estafilotrombina. La actividad de la proteasa lleva a la conversión del fibrinógeno en fibrina. Probablemente, las bacterias se protegen de las defensas fagocíticas e inmunes causando coagulación localizada.

- **Lipasa**

En reacción a una infección, el hospedador puede producir una variedad de ácidos grasos y otras moléculas de lípidos que actúan como surfactantes que rompen la membrana bacteriana, especialmente cuando se forma un absceso. Las lipasas y una enzima conocida como enzima metabolizadora de ácidos grasos (FAME) producida por *S. aureus* tienen un efecto negativo sobre la función inmune.

- **Proteasa**

La serina es una proteasa estafilocócica que se la conoce también con el nombre de proteasa V8. Con la función de bloquear de la acción de unión de los anticuerpos (IgG) hacerlos por lo tanto inactivos. Esta proteasa es responsable de la degradación de proteínas de unión a fibronectina, induciendo la proliferación bacteriana después de la adherencia inicial. También se le asignó un papel de protección contra péptidos antimicrobianos. Además, pueden contribuir a la destrucción de las proteínas tisulares y mejorar la invasividad. Otra posible función de las proteasas, indudablemente importante desde el punto de vista nutricional, es la obtención de nutrientes desde el ambiente.

- **Hialuronato liasa e hialuronidasa**

Hialuronidasa y la hialuronato liasa representan una familia de enzimas que digieren el ácido hialurónico y se asocian con la virulencia. Se sugirió que su actividad en la despolimerización

del ácido hialurónico presente en el tejido conectivo contribuye al proceso infeccioso por promover la difusión a través de la degradación de los tejidos.

- **Toxinas epidermolíticas**

Las toxinas exfoliativas (ET), ETA y ETB producidas por *S. aureus*, provocan un amplio espectro de enfermedad desde el impétigo al síndrome de piel escaldada en seres humanos, que resulta en ampollas generalizadas y pérdida de la epidermis. Las toxinas tienen una actividad específica de esterasas, pero no está claro cómo causa la separación epidérmica. Hay algunas pruebas de que las toxinas tienen actividad de proteasa, por lo que también es posible que esté destinado a una proteína específica en el mantenimiento de la integridad de la epidermis. Otra toxina, la ETC se describió en un equino con infección dérmica por *S. aureus*.

La epidermitis exudativa porcina es causada por cepas virulentas *S. hyicus* debido a toxinas que se asemejan a las exfoliativas de *S. aureus* en su actividad pero que no están estrechamente relacionados inmunológicamente. Las toxinas exfoliativas del *S. aureus* y *S. hyicus* también tienen especificidades de diferentes especies. ETA y ETB afectan la piel de los seres humanos y ratones pero no cerdos, mientras que la toxina exfoliativa del *S. hyicus* afecta a cerdos y pollos. En cepas de *S. pseudintermedius* de perros, se describió una toxina exfoliativa (toxina-like) y se propuso como un nuevo tipo de ET.

- **Otras exoenzimas**

Casi todas las cepas de *S. aureus* secretan varias enzimas extracelulares cuya función se cree que es la ruptura de tejidos y/o la inactivación de los mecanismos antimicrobianos del hospedador (por ejemplo, lípidos, defensinas, anticuerpos y activadores del complemento) para adquirir nutrientes para el crecimiento bacteriano y facilitar la difusión bacteriana. Estas exoenzimas incluyen lipasas, nucleasas, proteasas (serina, cisteína, aureolisina), hialuronidasa y estafiloquinasa (SAK).

- **Proteínas varias**

Peptidoglicano y ácido lipoteicoico

S. aureus tiene también otras proteínas específicas que pueden tener un profundo impacto en el sistema inmune innato y adaptativo. Estas proteínas incluyen el inhibidor del complemento (SCIN), la proteína extracelular de unión al fibrinógeno (EFB), proteína inhibidora de la quimiotaxis (CHIPS), péptido similar al receptor-1 de la proteína inhibidora (FLIPR) y la proteína de adhesión extracelular (EAP). El peptidoglicano y el ácido lipoteicoico de la pared celular son componentes que actúan como factores de virulencia y probablemente estimulan la liberación de citoquinas. Ambos componentes deben funcionar en conjunto para producir shock.

Patogénesis

En *S. aureus*, la expresión extracelular de las proteínas necesarias para las fases invasoras de infección y colonización son reguladas a través de varios *loci*. Estos modulan de una manera muy compleja y eficiente la respuesta altamente coordinada de la bacteria hacia ambientes cambiantes durante el proceso de infección.

Algunos ejemplos de enfermedades en animales

Mastitis en rumiantes

Staphylococcus aureus en el ganado bovino está involucrado principalmente en infecciones intramamarias de vacas lactantes representando el 30 % o más de las infecciones. La mastitis subclínica suele presentarse y muchas veces lleva a fracasos de tratamiento y las recurrencias son frecuentes.

Se considera que la ruta más habitual de la infección de mastitis estafilocócica es a través del pezón. Los estafilococos colonizan la punta del pezón, especialmente cuando está dañado o erosionado. Los organismos pasan por el conducto del pezón a la cisterna y posteriormente pueden establecerse en un área de tejido secretor. La adhesión *in vitro* de *S. aureus* a las células epiteliales de los conductos y alvéolos de la glándula mamaria indica que la colonización podría ser un paso importante en el desarrollo de mastitis. *S. aureus* además son capaces de unirse a moléculas de la matriz extracelular. Los estafilococos aislados de la mastitis bovina tienen la capacidad de unirse a la fibronectina, laminina, fibrinógeno y diferentes tipos de colágeno. La leche es un medio adecuado para la multiplicación de estas bacterias; durante este proceso se producen sustancias citotóxicas que causan la infiltración de la glándula mamaria por neutrófilos. La agregación de neutrófilos produce coágulos en la leche y edema interalveolar, los estafilococos y neutrófilos obstruyen entonces los lobulillos. Las bacterias permanecen en los conductos y alvéolos de donde se excretan intermitentemente. *S. aureus* se multiplican intensamente en forma local logrando producir abscesos y/o granulomas.

Enfermedad en aves de corral

La enfermedad estafilocócica es común en las aves de corral, resultando en dermatitis bacteriemia, osteomielitis, artritis y sinovitis. La cojera debido a una enfermedad estafilocócica tiene un alto impacto económico en la industria avícola. La incidencia de la enfermedad es variable y depende de factores ambientales y las prácticas de manejo. Generalmente se produce por el ingreso de un cuerpo extraño contaminado con *S. aureus*. En algunos casos puede pasar a la circulación produciendo septicemia generalmente en aves adultas. Si las aves no mueren en la primera fase septicémica, los estafilococos circulantes pueden inducir inflamación en muchos sitios por todo el cuerpo. Las lesiones consisten en artritis, tenosinovitis,

osteomielitis, condronecrosis bacteriana, endocarditis y abscesos o granulomas. *S. aureus* es una de las principales causas de debilidad de las patas en criaderos de pollos de engorde.

La condronecrosis bacteriana (también llamada necrosis de la cabeza femoral) en las aves de corral es una enfermedad en la que participa principalmente *S. aureus*. Generalmente llegan por vía sistémica y se pueden depositar en los vasos sanguíneos y alrededor de la placa de crecimiento de los huesos, donde se unen a proteínas y al colágeno. La oclusión parcial de estos vasos por colonias bacterianas y por la infiltración de células de la inflamación conduce a falta de irrigación sanguínea local, que se traduce en la formación de micro abscesos y necrosis ósea.

Enfermedades en el conejo

En conejos, *S. aureus* puede infectar produciendo pequeñas lesiones cutáneas. Otras posibles vías de entrada pueden ser el muñón umbilical en los conejos recién nacidos y también por vía genitourinaria. La glándula mamaria a menudo se infecta, aunque raramente ingresa produciendo mastitis, causando lesiones locales en pezones y el tejido circundante. Se pueden distinguir dos tipos de infección por *S. aureus*: el primero es causado por cepas de baja virulencia, que afecta a un número limitado de conejos y el segundo es debido a cepas de alta virulencia, originando la propagación epidémica de la enfermedad en los criaderos. Las lesiones y signos clínicos difieren según la edad de los conejos afectados. En los animales recién nacidos sin pelo, pueden sufrir de dermatitis exudativa con pústulas superficiales; en los más jóvenes se notan abscesos subcutáneos, conjuntivitis y rinitis purulenta. Ocurren también pododermatitis y abscesos subcutáneos con frecuencia en conejos de engorde. En todas las edades, pueden observarse abscesos internos (por ejemplo, en pulmones e hígado). Metritis, mastitis, artritis, parodontitis, sinusitis y otitis media también pueden ser vistos en asociación con septicemia.

Epidermitis exudativa en porcino

La epidermitis exudativa porcina es causada por cepas virulentas de *S. hyicus* que producen toxina exfoliativa. Las cepas virulentas y avirulentas de *S. hyicus* pueden estar presentes simultáneamente en la piel de lechones tanto enfermos como sanos. Cuando existe un factor desencadenante como un trauma de la piel, permite que las bacterias se establezcan en la dermis. Las proteínas de unión a fibronectina en la superficie bacteriana pueden ser importantes en la adhesión bacteriana a fibronectina aunque la capacidad de unión a fibronectina de *S. hyicus* es baja comparada con la de *S. aureus*. La primera línea activa de defensa de los cerdos es la de fagocito-opsoninas, que puede ser eludida por cepas de *S. hyicus* a través de sus cápsulas y de la proteína A. Esto es seguido por la acción de la toxina exfoliativa, dando por resultado la separación de las células de la epidermis. Esta separación de las células del estrato espinoso en las primeras etapas de la infección permite la rápida propagación de las bacterias en la epidermis. Las reacciones producidas por el hospedador

explican la exudación masiva que conduce a deshidratación y eventualmente a la muerte. Aunque las infecciones *S. hyicus* en cerdos comúnmente afectan sólo la piel, esta condición puede causar pérdidas graves. Inicialmente, los cerdos tienen costras amarillento amarroadas en cara y orejas. Cuando la enfermedad se vuelve más severa, la piel se torna grasosa y se cubre con una capa de color marrón oscuro producto de la suciedad que es fácilmente atrapada.

Pioderma en perros

La piodermia del perro es causada por *S. pseudintermedius*. La exposición de proteínas extracelulares favorece la colonización y adherencia por ciertas cepas de *Staphylococcus*. La producción frecuente de toxinas con acción sobre leucocitos y enterotoxina estafilocócica por las cepas aisladas a partir de las lesiones de piel sugiere que estas toxinas son importantes en la patogénesis y supervivencia estafilocócica. Todavía no están completamente dilucidados los factores de la patogenia de esta enfermedad.

Cepas de *S. aureus* de colonias pequeñas

Las variaciones de tamaño de las colonias produciendo algunas pequeñas, representan una subpoblación de origen natural de crecimiento lento de *S. aureus*, con un fenotipo distinto y con características patogénicas. Estas variantes de *S. aureus* parecen causar infecciones recurrentes que son persistentes muchos años después de la cura de la infección inicial. Como dato interesante es que parecen resistir a la acción antibiótica por permanecer viables dentro de las células evitando así además la acción fagocítica. Estas cepas productoras de colonias de pequeño tamaño son defectuosas en el transporte de electrones, con menor metabolismo y ésta sería la razón por la cual forman colonias pequeñas e incoloras y no hemolíticas. Un factor importante a tener en cuenta es que son más tolerantes a los antibióticos β -lactámicos y por su bajo potencial de membrana, hace también resistentes a los antibióticos aminoglucósidos.

Respuesta inmune

La piel y las mucosas son excelentes barreras para prevenir la invasión por bacterias, como los estafilococos. Sin embargo, después de que se ha dañado la piel o las membranas mucosas, la principal defensa del hospedador contra una infección estafilocócica consiste en la fagocitosis de las bacterias por los leucocitos polimorfonucleares (PMNs). Generalmente, después del reconocimiento de las bacterias por los PMN, se lleva a cabo la fagocitosis y la destrucción intracelular; sin embargo, los PMNs no siempre son capaces de eliminar la infección. Esto puede ser debido a ciertos factores antifagocitarios antes explicados producidos por *S. aureus*. Además, se demostró *in vitro* que *S. aureus* puede eludir los mecanismos de defensa del hospedador por invasión de las células epiteliales y las mioepiteliales mamarias y por replicar dentro de las células epiteliales.

Las citoquinas y otros factores pro-inflamatorios pueden ayudar en la defensa del hospedador contra la infección estafilocócica pero su papel se desconoce. Por el contrario, una liberación masiva de citoquinas conduce a la enfermedad severa puede ser inducida por la expresión de cepas de estafilococos, como entero-toxinas o la toxina TSS, que provocan la activación de más del 25 % de todas las células T en el cuerpo.

Factores predisponentes

El control preventivo de *S. aureus* y otros estafilococos en infecciones intramamarias bovinas se basa en dos tipos de medidas. La higiene durante el ordeño es importante para limitar la propagación de infecciones intramamarias en rodeos. Por otro lado, si bien el tratamiento sistemático con antibióticos por vía intramamaria en el secado para curar las infecciones intramamarias subclínicas crónicas y para prevenir nuevas infecciones durante el período seco se ha recomendado, el buen uso de los antimicrobianos desaconsejaría esta práctica.

En las aves de corral, los factores predisponentes para la enfermedad por *S. aureus* lo constituyen los objetos punzantes. Debe prestarse especial atención al manejo de criaderos y a la higiene puesto que incubadoras y nacedoras son ideales para el crecimiento bacteriano. Puede haber puntos en el ciclo de producción donde prácticas mejoradas de higiene pueden reducir o eliminar la incidencia inicial de *S. aureus* en pollitos, lo que disminuye el riesgo de enfermedad clínica en pollos de engorde. El compromiso inmune debido a otras infecciones por ejemplo las infecciones como la bursitis infecciosa viral, pueden promover el desarrollo de las infecciones estafilocócicas sistémicas.

En conejos, *S. aureus* invade las lesiones traumáticas que pueden ser debido a suelos de mala calidad como jaula alambre o peleas entre animales. Factores hereditarios y el peso corporal de los animales también juegan un papel en el desarrollo de pododermatitis debido a cepas de alta o baja virulencia de *S. aureus*.

En lechones, los ectoparásitos y las lesiones traumáticas pueden permitir al *S. hyicus* establecer una infección.

En perros, está relacionada con el desarrollo de problemas dermatológicos asociados a *S. pseudintermedius* a causas anatómicas, como pliegues de la piel y a predisposición física (por ejemplo, los perros expuestos a lesiones traumáticas). La predisposición inmunológica son probablemente importantes, pero las condiciones predisponentes siguen siendo en gran parte desconocidas.

Inmunidad y su impacto sobre la patogénesis

Lograr una vacuna para estafilococos es difícil puesto que la inmunidad protectora a infecciones estafilocócicas parece no existir en un grado significativo. Para las mastitis producidas por *S. aureus* en bovinos, se realizaron numerosos intentos de vacunación con células bacterianas tanto vivas como muertas, paredes celulares bacterianas, toxoide o preparaciones de células muertas. Si bien en varios experimentos se observó una reducción en la frecuencia y gravedad de infecciones de las mastitis clínicas; nunca se logró una protección completa contra infecciones en las mastitis bovinas. También se sugirió la vacunación como un posible método para el control de los estafilococos en otras especies animales, sin embargo, esta inmunización no pudo evitar la presentación clínica de la enfermedad en los animales.

La respuesta inmune a estafilococos es complicada, particularmente *S. aureus* y otros *Staphylococcus* poseen una batería de mecanismos muy variada para evitar la defensa del hospedador y producir enfermedad. Dependiendo de esta relación hospedador-parásito y el medio ambiente que favorece el ingreso de esta bacteria al organismo se producirá o no la enfermedad. Sumado a esto la aparición de cepas resistentes a los antibióticos en medicina humana y animal llevan a este microorganismo a la cima de los probables patógenos de la mayoría de las especies animales. Se requiere todavía, una importante investigación antes de que se puedan tomar medidas preventivas eficaces contra estas infecciones.

Bibliografía

- Costa AR, Batistão DWF, Ribas RM, Sousa AM, *Staphylococcus aureus* virulence factors and disease. <http://www.formatex.info/microbiology4/vol1/702-710.pdf>
- Couvé-Deacon E, Tristan A, Pestourie N, Faure C, Doffoel-Hantz V, Garnier F, Laurent F, Lina G, Ploy MC. Outbreak of Panton-Valentine Leukocidin–Associated Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Infection in a Rugby Team, France, 2010–2011 Emerging Infectious Dis. 2016; 22(1):96-9.
- DeLeo FR, Diep BA, Otto M. Host Defense and Pathogenesis in *Staphylococcus aureus* Infections Infect Dis Clin North Am. 2009; 23(1): 17–34. doi:10.1016/j.idc.2008.10.003.
- Fournier B, Philpott DJ. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the Innate Immune System Clin.Microbiol. Rev. 18 (3): 521–540. 2005.
- George AW. *Staphylococcus aureus*, antibiotic resistance mechanisms, mrsa and others By F(AAM) V7127 HC 05 RC Educational Consulting Services, Inc. P.O. Box 1930, Brockton, MA 02303-1930 (800) 441-LUNG / (877) 367-NURS 68p.
- George Y. Liu. Molecular Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Infection Pediatr Res. 2009; 65(5 Pt 2): 71R–77R. doi:10.1203/PDR.0b013e31819dc44d.
- Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. Clin Infect Dis. 1, 46(Suppl 5): S350-S359. 2008.
- Hageman JC, Uyeki TM, Francis JS, Jernigan DB, Wheeler JG, Severe Community-acquired Pneumonia Due to *Staphylococcus aureus*, 2003–04 Influenza Season Emerging Infectious Dis. 2006; 12(6): 894-9.
- Hermans K, Devriese LA, Haesebrouck F. *Staphylococcus* Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, Fourth Edition Edited by C L Gyles, J F Prescott, J G Songer, and C O Thoen 2010 Blackwell Publishing ISBN: 978-0-813-81237-3 p. 75-90.
- Jones TF, Kellum ME, Porter SS, Bell M, Schaffner W. An Outbreak of Community-Acquired Foodborne Illness Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Emerging Infectious Dis. 2002; 8 (1) 82-4.

- Leggett HC, Cornwallis CK, West SA. Mechanisms of Pathogenesis, Infective Dose and Virulence in Human Parasites. *PLoS Pathog.* 2012; 8(2): e1002512. doi:10.1371/journal.ppat.1002512.
- Mecenas J, Strauss EJ. Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence: Type III Secretion and Pathogenicity Islands Vol. 2, No. 4-October-December 1996 271-288 *Emerging Infectious Diseases*.
- Ochoa TJ, Mohr J. Community associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Pediatric Patients *Emerging Infectious Diseases*. 2005; 11 (6): 966-8.
- Pereira O, Botelho CM. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education (A. Méndez-Vilas, Ed.) *Formatex* 2013 702-710.
- Plata K, Rosato AE, Grzegorz Węgrzyn G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity *Acta Biochimica Polonica* Vol. 56 No. 4/2009, 597-612.
- Seifert H, Oltmanns D. *Staphylococcus lugdunensis* Pacemaker-related Infection, *Emerging Infectious Diseases* 11 (8): 1283-1286. 2005.
- Sjölund M, Tano E, Blaser MJ, Andersson DI, Engstrand L. Persistence of Resistant *Staphylococcus epidermidis* after Single Course of Clarithromycin *Emerging Infectious Diseases* 11 (9): 1389-1393. 2005.
- StarkLinköping L. *Staphylococcus aureus* aspects of pathogenesis and molecular epidemiology. University Medical Dissertations No. 1371 Department of Clinical Microbiology, Ryhov County Hospital, Jönköping Division of Medical Microbiology Department of Clinical and Experimental Medicine Faculty of Health Sciences Linköping University, Sweden Linköping 2013 81 p.
- Stevens DL. Streptococcal Toxic-Shock Syndrome: Spectrum of Disease, Pathogenesis, and New Concepts in Treatment. *Emerging Infectious Diseases* 1 (3): 69-79. 1995.

CAPÍTULO 9

Estreptococos β -hemolíticos

Bautista L. Emilia y María Fernanda Gómez

Los estreptococos son patógenos de importancia en humanos y animales. *Streptococcus* es un género bacteriano conformado por más de 40 especies agrupadas en función de diversos criterios, los cuales sufrieron diversos cambios taxonómicos a través de los años.

Clasificación

Streptococcus se caracterizan por ser cocos grampositivos, que se dividen en un solo plano, por lo cual crecen en forma lineal de a pares o en cadenas; catalasa negativos, con requerimientos nutricionales complejos y la mayoría de las especies son anaerobias facultativas. La primera clasificación de ellos se basa en la capacidad que tienen de producir distintos tipos de hemólisis: α - incompleta, hay reducción de la hemoglobina, se observan una zona verdosa alrededor de las colonias, β -completa, lisis total de los glóbulos rojos y γ -la hemólisis no se visualiza.

Los estreptococos patógenos para los animales domésticos se pueden agrupar por su adaptación a órganos/sistemas corporales específicos. Así, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis* causan enfermedad en la ubre; *S. equi*, *S. canis* (algunos tipos M) y *S. porcinus* son patógenos de los linfáticos de cabeza y cuello; *S. pneumoniae* causa enfermedad en el tracto respiratorio inferior de equinos; *S. suis* está adaptado para sobrevivir en las células mononucleares de la sangre que lo transportan al sistema nervioso central, pulmones y articulaciones. Por otra parte, todos estos estreptococos exhiben grados variables de especificidad de hospedador; en contraste con ellos, se encuentra *S. zooepidemicus*, aunque estrechamente relacionado con *S. equi*, es un agente patógeno oportunista, de diferentes sistemas corporales y de una variedad de hospedadores. Hay especies que se asocian con infecciones zoonóticas, aunque no son tenidas en cuenta a pesar de que la frecuencia y la gravedad de los brotes aumentaron dramáticamente en los últimos años. Esto puede deberse a la falta de identificación ya que las especies respectivas a menudo no son consideradas en los procedimientos de diagnóstico médico en humanos. Las cuatro especies asociadas a

principales zoonosis estreptocócicas son *Streptococcus canis*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Streptococcus iniae* y *Streptococcus suis*.

En 1930, Rebecca Lancefield sistematizó la clasificación de los estreptococos, basándose en un antígeno de superficie: carbohidrato de la pared celular o ácido lipoteicoico. Esta clasificación diferencia a las especies β -hemolíticas en grupos denominados con letra capital de la A hasta la W. Algunos estreptococos α o γ hemolíticos no codifican el antígeno de Lancefield, ejemplo *S. pneumoniae*. Las principales especies patógenas de estreptococos, para el hombre y los animales, pertenecen a una división de las β -hemolíticas denominada piogénicos (producen infecciones supurativas) y se encuentran ubicadas en los grupos A, B, C y G. En la tabla 1 se citan las principales especies de estreptococos agrupadas según presencia del antígeno de Lancefield. Algunas especies de estreptococos patógenos, *S. uberis*, *S. parauberis* y *S. pneumoniae*, no son agrupables en el esquema de Lancefield y se identifican por características como fermentación de hidratos de carbono, capacidad de crecer a diferentes temperaturas, tolerancia a altas concentraciones de cloruro de sodio, sensibilidad a la optoquina, solubilidad en bilis y secuenciación del ARNr 16S.

Tabla 1. Grupos de Lancefield y especies de *Streptococcus* de importancia

Grupo de Lancefield	Especie de <i>Streptococcus</i>
A	<i>S. pyogenes</i>
B	<i>S. agalactiae</i>
C	<i>S. equi</i> , <i>S. dysgalactiae</i>
D	<i>S. bovis</i> (<i>S. equinus</i> , <i>S. gallolyticus</i> , <i>S. pasterurianus</i> , <i>S. infantarius</i>)
E	<i>S. porcinus</i> ¹
F	<i>S. anginosus</i> , <i>S. constellatus</i> ²
G	<i>S. canis</i> , <i>S. uberis</i> ³
R	<i>S. suis</i> ⁴

1. Aislamientos de esta especie también pertenecen a los grupos P, U y V. 2.- Aislamientos de esta especie también pertenecen a los grupos C, A y G. 3.- Aislamientos de esta especie también pertenecen al grupo E. 4.- Aislamientos de esta especie también pertenecen a los grupos S y T.

Los principales factores de virulencia y enfermedades asociadas con las especies de estreptococos más frecuentemente aislados en muestras de origen animal se muestran en la tabla 2. La comparación de las secuencias disponibles del genoma de los estreptococos piogénicos muestra que aproximadamente el 66 % del contenido genético es común a todos; el resto es variable y está formado por genes asociados con pro-fagos, elementos integrantes

conjugativos (ICEs), elementos de inserción (ISs) y otros genes adquiridos por transferencia horizontal.

En general, la virulencia de los estreptococos se basa en proteínas de superficies y de secreción y en estructuras que directa o indirectamente impiden la fagocitosis, están implicadas en la adhesión y el metabolismo de los carbohidratos, o inducen la liberación de citoquinas pro-inflamatorias. Los factores de virulencia mejor estudiados son la cápsula de ácido hialurónico, proteínas M antifagocíticas y exotoxinas pirogénicas. Sin embargo, otras moléculas, incluyendo estreptolisinas, proteasas, toxinas leucocida, activadores del plasminógeno (estreptoquinasa) y posiblemente receptores de plasmina que se encuentran en la superficie o secretadas, también contribuyen a la patogenicidad. La mayoría de los estreptococos patógenos tienen la capacidad de unirse a componentes del plasma del hospedador, como albúmina, inmunoglobulinas y fibrinógeno, y unirse a fibronectina, laminina y otros componentes del hospedador. Los organismos revestidos con uno o más de estos componentes plasmáticos pueden ser capaces de evadir las defensas del hospedador ya sea escapando de la detección o bloqueando el depósito de componentes opsonicos del complemento.

***Streptococcus* grupo A (GAS)**

La principal especie perteneciente a este grupo es *S. pyogenes*, patógeno exclusivamente adaptado a humanos y responsable de una amplia variedad de enfermedades, desde relativamente leves, como infecciones supurativas de superficies mucosas y piel, faringitis/amigdalitis, escarlatina, impétigo, erisipela, celulitis, abscesos y piodermia hasta menos frecuentes pero severas como fascitis necrotizante y el síndrome de shock tóxico estreptocócico, meningitis y neumonía, sepsis puerperal y septicemia. Algunas de estas infecciones pueden dejar secuelas no supurativas como fiebre reumatoidea, enfermedad cardíaca, glomerulonefritis. El grupo GAS es un importante problema en salud pública y causa morbilidad y mortalidad en todo el mundo. La principal vía de transmisión es por de contacto directo y particularmente a través de gotitas respiratorias. El tracto respiratorio superior y la piel son depósitos importantes para las infecciones por estas bacterias. La capacidad de GAS para establecer una infección en el nuevo hospedador en estos sitios anatómicos se debe principalmente a dos procesos fisiológicos distintos: la adhesión bacteriana y la colonización. Estos aspectos fundamentales de la patogénesis se basan en la variedad de factores de virulencia, que suelen estar bajo estricta regulación transcripcional. GAS producen tres grandes grupos de factores de virulencia: los que están asociados con la adhesión e invasión, los que modulan la respuesta inmune y finalmente las toxinas formadoras de poros: estreptolisinas S y O y superantígenos.

El contacto inicial entre las bacterias y las células humanas hospedadoras es llevado a cabo mediante la interacción entre adhesinas bacterianas (múltiples proteínas y macromoléculas) y

receptores celulares como integrinas, fibrinógeno, colágeno y proteínas de la matriz extracelular (fibrinonectina, laminina, vitronectina), formando uniones complejas.

El proceso de adhesión inicial se realiza en dos pasos, con interacciones débiles y/o inespecíficas seguidas por otras uniones más específicas y de alta afinidad. El primer paso está mediado por anexos de superficie que se extienden como los pili; el segundo paso se lleva a cabo a través de interacciones proteína-proteína o lectina-carbohidrato.

La principal adhesina y factor de virulencia de GAS es la proteína M, que al igual que las proteínas parecidas a M, se encuentran asociadas con la interacción patógeno-sistema inmune. Alteran la cascada de la vía clásica del complemento adhiriéndose al factor C4b, también afectan la vía alternativa interactuando con el factor H. La proteína M también tiene acción antifagocítica, bloqueando el sitio de unión del complemento y es una potente inductora de la inflamación al ser reconocida por los TLR-2.

Paso siguiente de la adhesión es la invasión. Los estreptococos invaden tejidos gracias a la presencia de múltiples enzimas líticas. Los tejidos del hospedador son degradados por proteasas SpeB, estreptoquinasas (activan proteasas del hospedador) y hialuronidasas.

La modulación de la respuesta inmune está mediada por productos bacterianos como proteasa SpeB que alteran la fracción C3b del complemento e inmunoglobulinas; proteasa ScpA que altera la fracción C5a del complemento y enlentece el flujo de células inflamatorias hacia el sitio de infección; Mac/Ides, altera la IgG humana y bloquea la fagocitosis; SpyCEP altera la diversas proteínas como IL-8, proteína-2 quimiotáctica de granulocitos y otras. GAS también desarrollaron estrategias para evadir la respuesta inmune innata produciendo ADNasas que le permiten escapar de los neutrófilos.

El tercer gran grupo de factores de virulencia está formado por múltiples toxinas como son las formadoras de poros **estreptoquinasas S y O** y **superantígenos**. Estos últimos también son moduladores de la respuesta inmune ya que son reconocidos directamente por el CMH-II y activan células T lo que conlleva a la liberación descontrolada de citoquinas pro-inflamatorias.

Tabla 2. Factores de virulencia presentes en las especies de estreptococos β -hemolíticos de importancia en medicina veterinaria⁷

Especie	Factores de Virulencia	Enfermedad
<i>S. agalactiae</i>	Polisacárido capsular; Proteínas C, R y X; Factor CAMP; Hialuronidasa; Ácido lipoteicoico; Proteasas CspA; Colagenasas; Neuraminidasa	Mastitis
<i>S. dysgalactiae</i> ¹	Hialuronidasa; Estreptoquinasa; Proteínas de unión a fibrinectina fnbA y B; Proteína G; Receptores para plasminógeno, Estreptodornasas; Proteína similar a M; Receptores para α -2-macroglobulina	Mastitis
<i>S. equisimilis</i> ²	Idem anterior; Estreptolisinas S y O	Artritis porcina; Neumonía en cachorros (perros y gatos); Linfadenitis, metritis y placentitis en yeguas
<i>S. equi</i> ³	Cápsula de ácido hialurónico; proteínas antifagocíticas SeM, Se18.9 e IdeE; Estreptolisina S; Exotoxinas pirógenas; Estreptoquinasas; Proteínas de unión a la fibrinectina; Proteasas; Proteína SzP de unión a tonsilas; Proteínas de unión a IgG	Adenitis equina
<i>S. porcinus</i>	Proteína M; Estreptoquinasa	Linfadenitis cervical porcina;
<i>S. canis</i>	Proteína M; Estreptolisina O	Metritis y vaginitis en perras y gatas; Bacteriemia neonatal en gatos; Linfadenitis en gatos jóvenes.

1. *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*. 2. *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. 3. *S. equi* subsp. *equi*.

⁷Otras especies de estreptococos de importancia en medicina veterinaria y no β -hemolíticas son *S. suis*, *S. uberis* y *S. pneumoniae*.

***Streptococcus* grupo B (GBS)**

Streptococcus agalactiae es la única especie integrante del grupo B. Este microorganismo es uno de los principales patógenos en bovinos y uno de los agentes etiológicos de la mastitis bovina. También se asocia con mastitis e infecciones invasivas en camélidos y ocasionalmente se pudo aislar de caninos, felinos, peces y hámster.

Streptococcus agalactiae de origen humano se aislaron a partir de muestras vaginales de pacientes con sepsis puerperal. En recién nacidos puede causar septicemia neonatal y meningitis. GBS coloniza tractos gastrointestinal y genitourinario de individuos sanos y enfermos.

Las cepas de origen humano y bovino de GBS, son distintas y sólo hay evidencias limitadas respecto de la transmisión inter-especie. La fermentación de salicina y lactosa, producción de bactericinas y tipificación por fagos, son herramientas útiles para diferenciar el origen de las cepas.

Factores de virulencia

El genoma de GBS contiene entre 14 y 15 islas de patogenicidad. Es bien sabido que muchos determinantes de virulencia de *S. agalactiae* no se localizan en el cromosoma bacteriano, sino en estas islas. *S. agalactiae* codifica múltiples adhesinas que se expresan en su superficie de forma coordinada con la cápsula y son responsables de la interacción con las células hospedadoras. Sus funciones están vinculadas con la adherencia, invasión, fijación de hierro, metabolismo, transporte e inhibición de la fagocitosis: proteínas de adhesión a fibrina, fibrinógeno y laminina; la proteína Srr (proteínas ricas en serina) que le permite unirse a la queratina; estructuras superficiales similares a pilis; familia de adhesinas Alp/Rib.

Streptococcus agalactiae también codifica toxinas formadoras de poros como son, **hemolisinas** y **factorCAMP** (su rol en la patogenia de la infección permanece poco claro). Factores asociados a la modulación de la respuesta inmune: **proteasa ScpB** (similar a la GcpA del grupo GAS), altera la función de la fracción C5a del sistema del complemento y anula la acción de los PMN. También interfiere en el proceso de adhesión, cortando proteínas del hospedador. **CspA** con función similar a SpyCEP de GAS, altera el fibrinógeno y proteínas de la matriz extracelular y degrada quimiocinas. El **polisacárido capsular** es antifagocítico. Incrementa la afinidad del factor H de control del sistema del complemento para C3b unido a la superficie de la pared celular y por lo tanto reduce la actividad de la convertasa C3 y el posterior depósito de C3b en la célula hospedadora. El polisacárido capsular se expresa menos en las cepas de origen bovino que en las humanas.

Streptococcus agalactiae ingresa por el conducto del pezón, la colonización de la glándula es favorecida por la adhesión al epitelio. La queratina y los ácidos grasos de cadena larga bacteriostáticos del conducto del pezón, son la primera barrera de penetración física del revestimiento epitelial. La multiplicación bacteriana está controlada por el sistema

lactoperoxidasa tiocianato- H_2O_2 ⁸, por lisozima y por la acción de la leche durante el ordeño. La multiplicación en el epitelio de los pezones y del conducto da como resultado una inflamación y fibrosis progresiva lenta. Aunque *S. agalactiae* rara vez penetra en el epitelio, algunas vacas pueden experimentar una invasión transitoria durante los primeros días, en que el organismo entra en los vasos linfáticos y viaja a los ganglios linfáticos supra-mamarios. La liberación de quimiotácticos por parte de las células hospedadoras dañadas y *S. agalactiae*, atraen a PMN, que fagocitan y matan a muchos de los estreptococos invasores. Dado que la leche normal tiene un contenido de complemento muy bajo y por lo tanto no puede servir como fuente de C3, la opsonización se deriva probablemente de C3 en el exudado inflamatorio, el cual se fija en la superficie bacteriana después de la activación de la vía alternativa del complemento. La invasión inicial es más probable que resulte en la colonización en las vacas mayores y en las glándulas mamarias, donde hay retraso en la llegada de PMNs en el sitio de la invasión. La muerte de PMNs y la liberación de enzimas lisosómicas causan daño tisular adicional e inflamación. La formación de tapones de fibrina en los conductos lácteos más pequeños puede conducir a la involución del tejido secretor y a la pérdida de la capacidad de producción de leche ("agalactia"). Sin tratamiento, la bacteria persiste frente a la respuesta inmune del hospedador y la infección y la mastitis se convierten en crónicas. El efecto antifagocítico del polisacárido capsular puede ser el factor importante de virulencia bacteriana en la persistencia.

Inmunidad

Gran parte de la actividad protectora del calostro, contra *S. agalactiae* está asociada con IgA e IgM. Los anticuerpos séricos parecen tener poco o ningún efecto protector. Las aglutininas en la leche de las vacas infectadas, junto con el fracaso de los mecanismos de depuración bacteriana en la ubre, sugieren que la respuesta inmune adaptativa es insuficiente. Sin embargo, las inmunoglobulinas específicas para el polisacárido capsular pueden jugar un papel importante en mejorar la evolución de la enfermedad. La antigenicidad del polisacárido del grupo B se incrementa considerablemente conjugándolo con proteínas, como ovoalbúmina. La inmunización de vacas con este conjugado produjo respuestas de IgG1 e IgG2 séricas específicas contra el polisacárido cápsular. Otros enfoques para la inmunización del ganado bovino incluyen el uso de la proteína gliceraldehídos-3-fosfato deshidrogenasa superficial (receptor de plasmina, GAPDH) y un antígeno CAMP quimérico compuesto de epitopes de los factores de CAMP de *S. agalactiae* y *S. uberis*. Esta combinación es una promesa como vacuna de subunidad contra *S. uberis* y *S. agalactiae* productores de mastitis.

⁸El sistema lactoperoxidasa tiocianato comprende una serie de reacciones que se producen de forma natural en diversos fluidos orgánicos (saliva, leche, lágrimas, etc.). Se estima que su función es proteger al organismos frente a diversos patógenos. Para que el sistema funcione se requiere la presencia de peroxidasa, tiocianato (SCN^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La enzima en presencia de H_2O_2 , cataliza la oxidación de SCN^- originando diferentes productos con actividad antimicrobiana.

***Streptococcus* grupo C (GCS)**

El grupo C de estreptococos está constituido por especies patógenas de origen animal, varias de ellas reconocidas como oportunistas. Del mismo modo que ocurre con GAS y GBS, el hombre puede ser portador de ellos y ocasionan infecciones similares a *S. pyogenes*, como faringitis e impétigo. Las infecciones en humanos, normalmente son de origen animal pudiendo causar brotes característicos con complicaciones severas como glomerulonefritis. Las principales especies que integran el grupo son *S. dysgalactiae* y *S. equi*.

***Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*(*S. dysgalactiae*)**

Streptococcus dysgalactiae son α -hemolíticos o no hemolíticos. A pesar de que se consideran patógenos exclusivos de los animales, se notificado tres casos esporádicos de infección en humanos: una paciente con celulitis ascendente de miembros superiores luego de haber estado en contacto con pescado crudo, infección de rodilla por el implante de una prótesis y más recientemente, en un paciente con endocarditis infecciosa. En medicina veterinaria, es un importante patógeno asociado a mastitis bovina, estimulando una severa respuesta inflamatoria en la glándula mamaria, lo que da lugar a importantes pérdidas económicas para la industria láctea. El principal problema se debe al hecho de que se considera una bacteria presente en el medio ambiente. Dentro de las ubres, *S. dysgalactiae* puede unirse e internalizarse en las células epiteliales mamarias, multiplicarse y colonizar el tejido. Produce una serie de proteínas de superficie que se asocian con su virulencia, e interactúan específicamente con las proteínas del hospedador. Se presume que desempeñan un papel importante en la inducción de la respuesta inmune.

Factores de virulencia

Los factores de virulencia hasta ahora reconocidos en *S. dysgalactiae*, son: proteínas de superficie que interactúan específicamente con proteínas de la membrana plasmática y de la matriz extracelular del hospedador, como: α -2-macroglobulina, plasminógeno, albúmina, fibrinógeno, fibronectina, vitronectina y colágeno; genes que codifican proteínas que intervienen en la mastitis, como α -2-macroglobulina, IgG o Mig que es una proteína de unión a IgA; Mag, proteína de unión a la α -2-macroglobulina o IgG; una proteína similar a la proteína M que se une con el fibrinógeno. Otra proteína identificada es GapC con actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). GAPDH es una enzima glicolítica involucrada en la generación de energía bacteriana que es esencial para el crecimiento. En varias bacterias patógenas, la GAPDH se describió como una proteína asociada con la virulencia debido a su capacidad para unirse a varias proteínas del hospedador o para conferir resistencia frente a especies reactivas de oxígeno producidas por células fagocíticas. Se expresa como una molécula de superficie soluble. En ratones, activa directamente células B, LT e induce la

maduración de células plasmáticas que secretan Ig anti-GAPDH. Estos efectos son más consistentes con la observación de que la reducción de la actividad de IL-10 aumenta el reclutamiento de neutrófilos y la muerte bacteriana. IL-10 promueve una respuesta tipo 2 de células T auxiliares y a continuación, regula la respuesta inmune mediadas por células. En la actualidad, se desarrollaron varias proteínas de superficie de *S. dysgalactiae* como componentes de vacunas recombinantes.

***Streptococcus dysgalactiae* subsp *equisimilis* (*S. equisimilis*)**

Según la nueva taxonomía, se clasifican como *S. equisimilis* todos los estreptococos pertenecientes a los grupos C o G que forman colonias grandes (en agar de sangre de oveja son grandes, grisáceas, rodeadas por una zona de β -hemólisis).

Streptococcus equisimilis está asociado a diversas enfermedades similares a las causadas por *S. pyogenes*. En la actualidad, se reconoce a *S. equisimilis* asociado no sólo a infecciones graves de tejidos blandos, sino también a infecciones sistémicas como síndrome de shock tóxico. Análisis genómicos revelaron que comparten genes que codifican factores de virulencia con *S. pyogenes*. Esto se debe principalmente a la transferencia horizontal de genes. Entre los cuales se incluyen C5a peptidasa, proteína M, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hialuronidasa, estreptoquinasa, estreptolisina O y S, entre otros. En consecuencia, las infecciones humanas relacionadas con *S. equisimilis* se asemejan a las asociadas con los estreptococos del grupo A. Incluyen faringitis, artritis séptica, neumonía, bacteriemia, endocarditis, meningitis, síndrome de shock tóxico estreptocócico, celulitis y fascitis necrotizante. Al igual que los estreptococos del grupo A, *S. equisimilis* también se asocia con secuelas post-infección como glomerulonefritis y fiebre reumatoidea.

Streptococcus equisimilis también se asocian con infecciones en equinos y otras especies animales, incluyendo adenitis, mastitis e infecciones de heridas y genitales. En la actualidad, se informó la presencia de clones de *S. equisimilis* adaptados a colonizar humanos y ocasionar procesos infecciosos en equinos.

Streptococcus equi

Streptococcus equi subsp. *equi* no fermenta el sorbitol, afecta sobre todo a caballos y no se documentó ninguna infección en humanos. *S. equi* subsp. *zoepidemicus* fermenta el sorbitol, causa enfermedad en humanos y se asocia con el consumo de productos lácteos contaminados, aunque esta subespecie afecta principalmente al ganado bovino.

***Streptococcus equi* subsp. *equi* (*S. equi*)**

Se presume que *S. equi* evolucionó a partir de una cepa ancestral de *S. zooepidemicus* asociada a una amplia variedad de enfermedades en caballos y otros animales y humanos. Ambos organismos comparten más del 80 % de homología de ADN con *S. pyogenes*. *S. equi* en particular, tiene mucho en común con *S. pyogenes*. Ambos son patógenos hospedadores específicos, comparten proteínas de superficie idénticas, fosfolipasa A2 y superantígenos (sAgs) y adquirieron genes que codifican toxinas mediante pro-fagos relacionados, sugiriendo que comparten un grupo de fagos común que permite la transferencia de genes entre especies. Ambos patógenos también causan enfermedades con ciertas similitudes entre sí, papera o adenitis y amigdalitis.

La comparación de las secuencias del genoma entre *S. equi* y *S. zooepidemicus* muestra que presentan al menos 96 % de homología de ADN, las diferencias incluyen la presencia de cuatro pro-fagos adquiridos por *S. equi* que portan genes que codifican las exotoxinas pirógenas, hialuronidasa, fosfolipasa A2 y muramidasa que aumentan su virulencia y modulan la respuesta inmune e inflamatoria en caballos. Dos locus para expresión de pilis potencialmente funcionales se encuentran en el genoma de *S. zooepidemicus* pero sólo uno en *S. equi*. No se explica aún la estricta adaptación de *S. equi* a los equinos. La única fuente de infección de *S. equi* es la secreción nasal o pus de un absceso, vía contacto directo a través del pienso, agua o material contaminado directamente entre animales. El catarro prolongado se asocia comúnmente con empiema de bolsa gular o senos craneales de los que, el microorganismo se descarga de forma intermitente. La infección persistente de tejido amigdalino parece ser poco común. El período de incubación varía de 3 a 14 días después de la exposición y la aparición de la enfermedad se caracteriza por fiebre, cansancio, descarga nasal, tos leve, dificultad para tragar e inflamación de los ganglios linfáticos mandibulares. La presión de los linfáticos retro faríngeos, su aumento de tamaño y el edema asociado, da lugar a la denominación de la enfermedad, Adenitis o Papera equina. Se puede evidenciar la formación de abscesos en pulmones, abdomen o cerebro. Las secuelas incluyen miocarditis, anemia, púrpura hemorrágica y glomerulonefritis. Estas últimas, implican la formación de complejos inmunes circulantes.

Factores de virulencia

Los factores de virulencia de *S. equi* incluyen la cápsula no antigénica de ácido hialurónico, hialuronidasa, estreptolisina S, estreptoquinasa, estreptodornasa, proteínas receptoras de factor Fc de IgG, ADP-ribotransferasa, exotoxinas pirogénicas SePE-I, H, L y M, péptidoglicano, proteína M, proteínas antifagocíticas SeM, Se18.9 e IdeE, equibactina y proteína de unión a la fibronectina. También puede producir una toxina antileucocítica.

Las cepas de *S. equi* virulentas, aisladas a partir de casos clínicos de adenitis, son capsuladas y producen colonias mucosas, mientras que las mutantes no capsuladas son mucho menos virulentas. La cápsula antifagocítica reduce en gran medida el número de estreptococos que se asocian con la superficie de los neutrófilos que posteriormente los

ingieren y eliminan. La cápsula también aumenta la carga negativa y la hidrofiliidad de la superficie bacteriana y produce un entorno reductor localizado que protege la actividad de proteasas y toxinas lábil al oxígeno tales como estreptolisina S. También es necesaria para el funcionamiento de la proteína SeM y posiblemente de otras proteínas de superficie.

Las **estreptoquinasas** producidas por *S. equi* interactúan con el plasminógeno para formar plasmina activa, una serina proteasa que hidroliza fibrina. No se comprobó el papel de la plasmina en la patogénesis de paperas, pero su acción lítica sobre la fibrina y proteínas puede ayudar en la propagación y la dispersión de las bacterias en el tejido. Otra función posible incluye la activación del complemento y la producción de un sustrato para el crecimiento bacteriano, de nitrógeno de bajo peso molecular.

Estreptolisina S, es la responsable de la β -hemólisis producida por *S. equi*. La unión de este complejo a eritrocitos resulta en la formación de un poro transmembrana ocasionando la lisis osmótica irreversible de la célula, un proceso similar a la hemólisis mediada por el complemento. También se observó daño en queratinocitos. *S. equi* y *S. zooepidemicus* no tienen gen para estreptolisina O.

El **péptidoglicano** de *S. equi* es un potente activador de la vía alternativa del complemento. Este es el proceso patológico básico de la adenitis, el flujo de PMN en los ganglios linfáticos, las tonsilas infectadas y en la mucosa del tracto respiratorio superior. El péptidoglicano también es un potente pirógeno, que induce la liberación de citoquinas como IL-6 y TNF.

Los genes de las exotoxinas pirogénicas SePE-I, H, L y M, son adquiridos por fagos. Los mitógenos pirogénicos tienen alta capacidad inmunomoduladora mediante la unión al mismo tiempo al CMH clase II y a la región variable de la cadena β del receptor de células T. El resultado es la estimulación y proliferación de células T no específicas, la liberación de citoquinas inflamatorias y la producción de una respuesta de fase aguda con fiebre alta, neutrofilia y fibrinogenemia. Estos efectos son característicos de paperas y pueden ser neutralizados por anticuerpos generados durante la convalecencia o por inmunización activa con cada mitógeno.

La superficie de *S. equi* presenta proteínas, algunas son adhesinas, otras tienen función enzimática o transportadora o como SeM, antifagocíticas. Las proteínas unidas también podrían bloquear el acceso de C3 o anticuerpos específicos en los sitios diana en el organismo.

La **equibactina**, potencial sideróforo, puede ser responsable de la alta proliferación de *S. equi* en condiciones de baja disponibilidad de hierro en tonsilas y ganglios linfáticos.

Patogénesis

Streptococcus equi ingresa a través de boca o nariz y se une a las células de las criptas de las amígdalas orales, paralizando las cilias de las amígdalas nasofaríngeas. Las adhesinas como la SzPSe se unen fuertemente a los receptores en las criptas de las tonsilas lingual y palatina. Las proteínas Fim también están implicadas en la etapa de adhesión. El papel de la fibrinectina en esta etapa de la patogénesis es desconocido. La proteína de fijación de fibrinectina, FNEB, expresada en la superficie de *S. equi* también puede contribuir en esta etapa inicial. Luego de un par de horas, es difícil detectar al microorganismo en la superficie de

la mucosa. Un pequeño número se encuentra en células epiteliales del tejido folicular y en los ganglios linfáticos que drenan la región faríngea/amigdalina. A las 48 horas, una gran cantidad de *S. equi* son visibles en la lámina propia. El péptidoglicano atrae a un gran número de PMN. El fallo de los PMN en fagocitar y eliminar a los estreptococos parece ser el resultado de una combinación del ácido hialurónico de la cápsula, toxina leucocídica y las tres proteínas antifagocíticas SeM, Se18.9 e IDEE. Esto culmina con la formación de numerosos grupos de cadenas largas de estreptococos extracelulares intercalados entre un gran número de PMN en degeneración. La capacidad de adquisición de hierro mejorada de *S. equi* proporcionada por la equibactina codificada por ICESe2 es posiblemente esencial en esta etapa de la patogénesis ya que el hierro está limitado en el interior avascular de los abscesos. Estreptolisina S y estreptoquinasa también pueden contribuir con el desarrollo de abscesos y dañan las membranas celulares por la activación de las propiedades proteolíticas del plasminógeno. Aunque la enfermedad involucra predominantemente las vías respiratorias superiores y los ganglios linfáticos asociados, se pueden producir metástasis a otros lugares. La diseminación hematogena puede ser a través de los canales linfáticos, lo que provoca abscesos en los ganglios linfáticos y otros órganos de tórax y abdomen con metástasis en cerebro.

Es claro el potencial de *S. equi* de colonizar otros sitios del cuerpo aparte de los ganglios linfáticos de cabeza y cuello y para la formación de complejos inmunes circulantes. La descarga nasal de *S. equi* por lo general comienza después de un periodo de incubación de 4 a 14 días y cesa entre 3 y 6 semanas después de la fase aguda. Sin embargo, algunos animales pueden seguir portando la infección en las bolsas guturales varios meses después de la recuperación clínica.

Inmunidad

Una vez superada la infección, aproximadamente el 75 % de los animales, desarrollan una inmunidad fuerte que persiste por cinco años. La resistencia adquirida parece ser principalmente humoral y mediada por anticuerpos contra SeM y otros antígenos aún no identificados únicos de *S. equi*. Anticuerpos anti-SeM producidos sistémica y localmente por sí mismos no protegen a los animales inoculados experimentalmente. La inmunización intranasal con un mutante SeM negativa de *S. equi* estimula una respuesta inmune protectora eficaz contra la estimulación intranasal.

El 25 % restante se vuelven susceptibles a un segundo episodio de la enfermedad en cuestión de meses, lo que probablemente representa un fracaso en un adecuado nivel de anticuerpos sistémicos. En la convalecencia se observa una fuerte respuesta humoral de IgG frente a las proteínas SeM, Se18.9, SzpSe, Se44.2, Se46.8, Se45.5, Se42.0 y estreptoquinasa. La respuesta de IgA e IgG en las mucosas sólo se ve en la fase aguda y en la convalecencia, pero no después de la vacunación intramuscular. La respuesta de IgA de la mucosa local a *S. equi* requiere la estimulación local y no se correlaciona con la respuesta humoral (IgG).

La leche de yeguas recientemente recuperadas de la infección contiene IgG e IgA con especificidades similares a aquellas del moco nasofaríngeo de los caballos convalecientes. Los anticuerpos calostrales ingeridos durante las primeras 24 horas de vida también muestran una

recirculación a la mucosa de la nasofaringe. Los potrillos amamantados son inmunes y suelen ser resistentes a la infección por *S. equi* hasta el destete.

La SeM es antifagocítica y protege a los ratones; al ser inoculada desencadena una respuesta de anticuerpos opsonocitofágicos y es un importante componente para las vacunas comerciales.

Profilaxis

En la actualidad, las vacunas se encuentran disponibles, pero ninguna puede considerarse completamente protectora contra la enfermedad.

Las primeras vacunas elaboradas para el control y la prevención de la adenitis equina, eran bacterinas obtenidas por inactivación de cultivos de *S. equi* en fase logarítmica de crecimiento. Éstas ocasionaban reacciones adversas severas (inflamación y abscesos) y debieron ser reemplazadas. Se desarrollaron entonces los “extractos vacunales”, eliminándose los componentes de la pared bacteriana muy irritantes como los péptidoglicanos. Estas vacunas contienen proteína SeM purificada. Su administración es vía intra-muscular; también se informaron casos en los cuales se produjeron abscesos en el sitio de inoculación. Este tipo de vacunas reducen la cantidad y severidad de casos clínicos pero no son capaces de prevenir la enfermedad. Estimulan una fuerte actividad opsonocítica del suero pero no de mucosas mediada por IgA o IgG anti SeM. Ambas respuestas son necesarias para hacerle frente a la re-infección. Es esencial evitar la vacunación de los caballos con signos clínicos de adenitis o convalecientes de la enfermedad. En presencia de un brote, la vacunación no reduce la gravedad del mismo y el hecho de una nueva exposición frente al inmunógeno, aumenta el riesgo de complicaciones inmunológicas. En situaciones en las que existe una historia de infección por adenitis, los títulos de anti-SeM deben medirse antes de vacunar a los caballos recuperados. Las recomendaciones sugirieron la vacunación de animales con un título inferior a 1:1600, pero datos más recientes sugieren que este punto de corte puede ser demasiado bajo.

Otro tipo de vacunas son las vivas modificadas. Para que el inmunógeno esté en contacto con el tejido linfático lingual y faríngeo (tonsilas), la vía de inoculación es intra-nasal, estimulando la respuesta inmune innata y en la mucosa local. Como todos los productos vivos modificados deben administrarse a animales clínicamente sanos, sin fiebre y jamás durante un brote de la enfermedad. También se informó la formación de abscesos, fiebre y depresión como acción colateral, siendo los animales más jóvenes los más susceptibles de sufrir este tipo de trastornos.

***Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*(*S. zooepidemicus*)**

Streptococcus zooepidemicus es comensal de mucosas, patógeno oportunista, se asocia con infección como secundario de infección viral, estrés o en tejidos injuriados. La denominación "zooepidemicus" deriva de su amplia gama de hospedadores. Produce mastitis en el ganado vacuno y caprino; neumonía, septicemia e infecciones de heridas en corderos y

perros; septicemia en pollos y delfines; linfadenitis en cobayos y en equino, es el patógeno más frecuentemente aislado de articulaciones, ganglios linfáticos, cavidad nasal, pulmones y útero. En humanos se asocia con el consumo de productos lácteos contaminados o por contacto con los caballos, teniendo el riesgo de desarrollar glomerulonefritis o falla renal.

Factores de virulencia

Streptococcus zooepidemicus comparte una gran cantidad de factores de virulencia con *S. equi*. Como era de esperar, ambas subespecies presentan 96 % de homología de ADN y los perfiles proteicos son similares. Dentro de las diferencias se destacan: la ausencia de genes para exotoxinas pirogénicas, equibactina E de fijación del hierro, dos proteínas antifagocíticas funcionales homólogas a SeM o Se18.9, así como otras proteínas secretadas o de superficie. La síntesis de la cápsula es muy variable y usualmente se pierde rápidamente luego del cultivo primario. Además, muchos aislamientos de *S. zooepidemicus* producen hialuronidasas. Las bacterias provenientes de amígdalas y otras mucosas de animales sanos son casi siempre no capsuladas.

Las cepas toxigénicas están asociadas con brotes de septicemia hemorrágica y neumonía en galgos y perros de refugio, pero carecen de genes conocidos para las exotoxinas pirogénicas. En esta especie se encontraron operones que codifican fimbrias y algunas proteínas con función de adhesinas. Por este motivo, esta bacteria tienen mayor capacidad de colonización que *S. equi* subsp. *equi*. Las proteínas SzP de *S. zooepidemicus* de equino son la base de la tipificación de Moore y Bryans; estas proteínas son protectoras y opsonogénicas para el ratón y se encuentran en aislamientos provenientes de diferentes especies animales. Se unen menos al fibrinógeno que la proteína SeM de *S. equi* subsp. *equi*. La familia de proteínas SzP parece funcionar como adhesina en la colonización de la nasofaringe y la mucosa genital.

Inmunidad

Los anticuerpos específicos contra las proteínas SzP en el suero equino son opsonicos y protectores para el ratón, por lo cual es probable que contribuyan a la protección en caballos y otros animales. IgA e IgG contra SzP en las secreciones nasofaríngeas, pueden tener un papel importante en el control del número de *S. zooepidemicus* en las amígdalas equinas. Además, la inmunización de yeguas con extractos bacterianos ofrece cierta resistencia a la endometritis causada por esta bacteria. Por su variada antigenicidad y la naturaleza oportunista de las infecciones que provoca, es difícil el desarrollo de vacunas. Una preocupación adicional es el riesgo de glomerulonefritis asociada con complejos de proteínas de estreptococos tales como SzP y sus anticuerpos específicos.

***Streptococcus* grupo E (GES)**

***Streptococcus porcinus* (*S. porcinus*)**

Streptococcus porcinus es el agente etiológico de la linfadenitis cervical contagiosa porcina. Si bien se lo incluye en el grupo E de Lancefield, también reacciona con los sueros de los grupos U, V o P. Afecta a cerdos jóvenes de 8 a 10 semanas de edad. Si bien *S. porcinus* se asoció con una variedad de infecciones oportunistas en caballos, gatos y humanos, los cerdos son el hospedador más frecuente. Como ocurre con otros estreptococos patógenos, el microorganismo se lleva en las amígdalas y se transmite por contacto directo a través de nariz, bebederos o materia fecal. Las infecciones experimentales resultan en hipertrofia de ganglios linfáticos mandibulares, parotídeos y retrofaríngeos aproximadamente 2 semanas después de la infección. Los ganglios abscedados drenan o se encapsulan.

Streptococcus porcinus es un coco encapsulado y produce estreptoquinasa específica para el plasminógeno porcino. Para su virulencia es necesario un factor antifagocítico similar a las proteínas M de *S. pyogenes*. La resistencia fagocítica de *S. porcinus* aumenta durante el crecimiento en suero porcino al 10 % o albúmina sérica bovina al 2 %.

***Streptococcus* grupo G (GGS)**

***Streptococcus canis* (*S. canis*)**

Streptococcus canis pertenece al grupo G de Lancefield y con frecuencia se lo asocia con las especies piogénicas estrechamente relacionada *S. pyogenes*, *S. equi* y *S. dysgalactiae*. La denominación *S. canis* se reserva para los estreptococos de origen animal que forman colonias grandes, β -hemolíticas, que reaccionan con el antisuero del grupo G, producen β -galactosidasa pero no hialuronidasa y difieren en la secuencia del ARNr 16S. Se distinguen así de las cepas de *S. equisimilis* de origen humano que reaccionan con el mismo antisuero pero son una población genéticamente diferente. Sin embargo, cepas de origen animal se aislaron ocasionalmente de lesiones en seres humanos.

La mucosa anal es el principal sitio donde *S. canis* coloniza a los perros. También puede encontrarse en genitales, ingle, barbilla, tonsilas, boca y nariz de perros y gatos. Las infecciones en los hospedadores son usualmente esporádicas y oportunistas y se encuentran en heridas, recto, glándula mamaria, próstata, ganglios linfáticos, endocardio, conducto auditivo, útero y piel. Desde finales de 1930, en Inglaterra, se informaron brotes de la enfermedad en perros con signos clínicos como abortos, septicemia neonatal, poliartritis e infertilidad. Informes ocasionales de Europa demuestran que sigue siendo una causa de mortalidad temprana en cachorros. También se asoció con síndrome de shock tóxico y fascitis necrotizante. Todos los aislamientos produjeron proteasas y un factor tipo CAMP, pero no se encontraron secuencias de exotoxina pirogénica o superantígenos conocidos. Estudios posteriores, identificaron un efecto inductor de bacteriófago de fluoroquinolona y la presencia

de un mitógeno. Por lo tanto, los efectos similares al superantigénico del mitógeno explicarían el choque tóxico resultante y la fascitis necrotizante.

En gatos, *S. canis* es el microorganismo más frecuentemente aislado de abscesos en piel, linfonódulos, mastitis, conjuntivitis, metritis y septicemia neonatal epizoótica.

Factores de virulencia

No hay mucha información acerca de los factores de virulencia de *S. canis*. No se detectaron hialuronidasas, estreptoquinasas o ácido hialurónico; sin embargo, produce grandes cantidades de estreptolisina O y proteína M.

Referencias

- Artiushin SC, Timoney JF, Sheoran AS, Muthupalani SK. Characterization and immunogenicity of pyrogenic mitogens SePE-H and SePE-I of *Streptococcus equi*. *Microbiol Path.* 2002; 32:71-85.
- Alber J, El-Sayed A, Estoepangestie S, Lämmler C, Zschöck M. Dissemination of the superantigen encoding genes *seel*, *seeM*, *szel* and *szeM* in *Streptococcus equi* subsp. *equi* and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Vet Microbiol.* 2005; 109(1-2):135-41.
- Beres SB, Sesso R, Pinto SW, Hoe NP, Porcella SF, DeLeo FR, Musser JM. Genome sequence of a Lancefield Group C *Streptococcus zooepidemicus* strain causing epidemic nephritis: new information about an old disease *PLoS ONE.* 2008; 3(8):e3026. doi:10.1371/journal.pone.0003026.
- Brouwer S, Barnett TC, Rivera-Hernandez T, Rohde M, Walker MJ. *Streptococcus pyogenes* adhesion and colonization. *FEBS Lett.* 2016; 590:3739–57.
- Guedes Silva L, Limeira Genteluci G, Correa de Mattos M, Glatthardt T, Sá Figueiredo AM, Teixeira Ferreira-Carvalho B. Group C *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in south-east Brazil: genetic diversity, resistance profile and the first report of human and equine isolates belonging to the same multilocus sequence typing lineage. *J Med Microbiol.* 2015; 64:551-8. doi: 10.1099/jmm.0.000052.
- Kromker V, Reinecke F, Paduch JH, Grabowski N. Bovine *Streptococcus uberis* Intramammary Infections and Mastitis. *Clin Microbiol.* 2014, 3:4. doi.org/10.4172/2327-5073.1000157.
- Rantala S. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* bacteremia: an emerging infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014; 33:1303-10. doi 10.1007/s10096-014-2092-0.
- Rato MG, Nerlich A, Bergmann R, Bexiga R, Nunes SF, Vilela CL, Santos-Sanches I, Chhatwal GS. Virulence Gene Pool Detected in Bovine Group C *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* isolates by Use of a Group A *S. pyogenes* Virulence Microarray. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(7):2070-74.
- Sitkiewicz I, Hryniewicz W. Pyogenic streptococci-Danger of Re-emerging Pathogens. *Poli J Microbiol.* 2015; 59(4):219-26.
- Timoney J. The pathogenic equine streptococci. *Vet Res.* 2004; 35(4):397-409.
- Timoney J. *Streptococcus*. 2010. En: Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Ames, Wiley-Blackwell, pp 51-73.
- Timoney J, Suther P, Sridhar V, Elineni S, Sergey C, Artiushin S. The Antiphagocytic Activity of SeM of *Streptococcus equi* Requires Capsule. *J Equine Sci.* 2014; 25(2):53-6.
- Waller AS, Paillot R, Timoney JF. *Streptococcus equi*: a pathogen restricted to one host. *J Med Microbiol.* 2011; 60:1231-40.

Yao D, Zhang H, Xintong W, Yu S, Wei y, Liu W, Wang J, Chen X, Zhang Z, Sun H, Yu L, Ma J, Tong C, Song B, Cui Y. Identification and characterization of CD4+ T-cell epitopes on GapC protein of *Streptococcus dysgalactiae*. *Microb Pathog.* 2016; 29:46-53.

CAPÍTULO 10

Leptospiras

Eleatrice María de las Mercedes Gatti

Las leptospiras son microorganismos helicoidales móviles con morfología particular que requieren medios de cultivo especiales (líquidos o semisólidos) para su aislamiento y desarrollo. Las leptospiras presentan una amplia distribución en el mundo.

Las cepas patógenas son los agentes causales de la leptospirosis, zoonosis de notificación obligatoria, identificada como una enfermedad infecciosa emergente. Gran parte del resurgimiento de la leptospirosis radica en los casos producidos por varios brotes en zonas inundadas en todo el mundo, este fenómeno no está restringido a regiones tropicales. En los animales domésticos produce grandes pérdidas económicas por abortos, agalactia y muerte perinatal. Clínicamente, la enfermedad en humanos tiene una gran diversidad de signos y síntomas, variando desde presentaciones subclínicas a un síndrome de infección multiorgánica de alta mortalidad. Como entidad clínica en el hombre es descrita por Larrey en el año 1800, estando caracterizada por ictericia, fiebre, petequias y hemorragias. Posteriormente en Heidelberg, en 1886, Adolf Weil describe una “afección peculiar” que cursa con ictericia y esplenomegalia.

Stimson, en 1907, utiliza la denominación *Spirochaeta interrogans* para bacterias con extremos en forma de gancho y forma de “signo de pregunta”, que observa a partir de la tinción con plata en el riñón de un paciente con diagnóstico de fiebre amarilla,

En 1915, Inadae Ido detectan espiroquetas y anticuerpos específicos en sangre de mineros japoneses con ictericia infecciosa. Martin y Petit, en 1917, describen la técnica serológica de microaglutinación con antígenos vivos (MAT) con fines diagnósticos. Como resultado de los análisis actuales, la taxonomía molecular basada en estudios del ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) propuesta en la segunda edición del cuarto volumen del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2010) reubica a las espiroquetas en el phylum Spirochaetes, Clase Spirochaetia con un solo Orden Spirochaetales que presenta cuatro familias: Spirochaetaceae, Brachyspiraceae, Brevinemataceae, Leptospiraceae (fig 1). La familia Leptospiraceae comprende el gran género *Leptospira* y dos géneros monoespecie *Leptonema illini* y *Turneriella parva*.

En la actualidad, para las especies del género *Leptospira* se emplean dos clasificaciones diferentes, una basada en las características fenotípicas de las mismas y otra en las

genotípicas. Aunque la clasificación más antigua; la fenotípica sigue siendo empleada debido a su correlación con la epidemiología de la enfermedad, la clasificación genotípica sigue aún en progreso y probablemente reemplazará a la anterior.

Según la clasificación fenotípica dentro del género *Leptospira* se encuentran dos especies:

- *L. interrogans* sensu lato (cepas patógenas)
- *L. biflexa* (cepas no patógenas)

Las leptospiras de cada especie se agrupan a su vez en serogrupos y el taxón básico de la clasificación es el serovar. Más de 60 serovares de *L. biflexa* han sido descriptos y más de 200 serovares, organizados en 24 serogrupos, son reconocidos dentro de *L. interrogans sensu lato*. Según la clasificación genotípica, en base a estudios de hibridación, se incluyen actualmente dentro del género *Leptospira*, un total de 20 especies.

Aparentemente hasta ahora de esas 20 especies, 9 serían patógenas, 5 de patogenicidad intermedia o desconocida y 6 no patógenas.

Un determinado serogrupo puede ser ubicado en varias especies diferentes. Por lo tanto, ni el serogrupo, ni el serovar predicen la especie de leptospira.

Epidemiología

La leptospirosis es considerada como la zoonosis de mayor distribución en el mundo. Es una enfermedad de los animales domésticos y de los de vida libre donde el hombre, es un hospedador accidental "sin salida". La forma de transmisión en humanos es usualmente tanto el contacto directo con orina, sangre u órganos de animales infectados, como la transmisión indirecta por exposición al medio ambiente contaminado por estas bacterias. En la cadena epidemiológica, es rara la transmisión de un ser humano a animales o a otro ser humano. El hombre resulta ser el eslabón final.

Es importante destacar que esta enfermedad es de denuncia obligatoria en el ámbito de la salud de nuestra región y los informes de la enfermedad en muchos casos no reflejan la incidencia concreta de la misma, sino que se vinculan a la experiencia profesional y las posibilidades de diagnóstico clínico y de laboratorio.

El contacto indirecto es importante para obreros de cloacas y excavaciones, recolectores de basura, mineros, efectivos de las fuerzas armadas que realizan maniobras militares de infantería, limpiadores de tanques sépticos, personal vinculado a la cría de peces, guardabosques, peones de campo, así como obreros migrantes, denominados en Argentina como "golondrinas", que trabajan en arrozales, cortando caña de azúcar, etc. El personal de laboratorio, también puede afectarse, siendo la 6.^a enfermedad en importancia por contagio en el laboratorio y la primera en importancia como causa de muertes (15%).

Las leptospiras son mantenidas en poblaciones de animales por los denominados reservorios naturales (hospedadores de mantenimiento) que son infectados por vía horizontal y vertical. La leptospirosis se mantiene por la colonización de los túbulos renales proximales del

animal hospedador. Un animal infectado puede permanecer sin mostrar síntomas y excretar organismos infectantes durante toda su vida. Las diferentes serovariedades de leptospiras están adaptadas a hospedadores específicos (de mantenimiento) en zonas endémicas a esas serovariedades. La prevalencia de la enfermedad varía notablemente entre los distintos países e incluso, entre las diferentes regiones de un mismo país.

Todos los mamíferos parecen ser susceptibles al menos a una especie de *Leptospira*. La enfermedad es rara en gatos y menos común en ovejas que en ganado bovino (Tabla 2).

Tabla 2. Serovariedades asociadas en leptospirosis animal

Enfermedad por especie	Serovariedades asociadas
ganado bovino	hardjo, pomona, grippotyphosa, canicola y icterohaemorrhagiae
ovejas y cabras	hardjo, pomona, grippotyphosa y ballum
Cerdos	pomona, grippotyphosa, bratislava, canicola, icterohaemorrhagiae, tarassovi y muenchen
Caballos	hardjo, pomona, canicola, icterohaemorrhagiae y sejroe
Perros	pomona, grippotyphosa, canicola, icterohaemorrhagiae, pyrogenes, paidjan, tarassovi, ballum y bratislava

Biología de las leptospiras

Las leptospiras son microorganismos filiformes delgados con extremos acodados, miden 0,1 μm por 6 a 20 μm , pero ocasionalmente los cultivos pueden contener células más largas, tamaño que les permite atravesar filtros de 0,45 y 0,22 μm . Presentan una disposición en espiras en número de 12 a 18, con una amplitud de la hélice de aproximadamente 0,1 a 0,15 μm y una longitud de la onda de 0,5 μm . Estas espiroquetas tienen una parte central que se mantiene rígida y extremos en punta; tanto uno o ambos extremos pueden presentarse doblados dando el aspecto distintivo de gancho (Figura 4).

Dos filamentos axiales (también llamados flagelos periplásmicos o endoflagelos) con inserciones polares están localizados en el espacio periplásmico y se extienden desde los extremos hacia el centro, sin superponerse. La estructura de las proteínas flagelares es compleja insertándose en el cilindro protoplasmático con un doble anillo en forma idéntica a los anillos de las bacterias gramnegativas. Las leptospiras pueden girar sobre su eje o progresar en distintas direcciones mostrando dos formas distintas de movimiento: traslacional y no traslacional.

Morfológicamente todas las leptospiras son indistinguibles, pero la forma individual de los aislamientos varía con los cultivos. Las leptospiras tienen la típica doble membrana común a otras espiroquetas, en la cual la membrana citoplásmica y la pared celular de peptidoglicano

están estrechamente asociadas y son recubiertas por la membrana externa (como en las bacterias gram negativas). El lipopolisacárido leptospiral tiene una composición similar al de otras bacterias gramnegativas, pero tiene menor actividad endotóxica.

El genoma leptospira está comprimido en dos secciones de distinto tamaño (Figura 6)

Las leptospiras no son observables en forma directa con el microscopio de luz transmitida o iluminación de campo brillante; para su visualización se recurre al microscopio de fondo oscuro (donde las bacterias reciben iluminación transversal por modificación de los condensadores - Fenómeno Tyndall) (Figura 8).

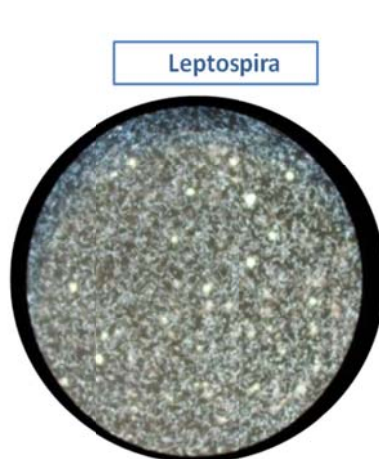


Figura 8. Observación microscópica en fondo oscuro.

La bacterioscopía directa en campo oscuro resulta de utilidad por su bajo costo cuando la muestra se obtuvo sin contaminación (técnica aséptica) y el observador está entrenado, pudiendo distinguir la morfología especial de las leptospiras así como su movimiento activo y vigoroso de elementos inertes de forma filamentosa (restos de membrana celular, fibrina, etc.) con movimiento vibratorio browniano.

Mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia

Generalidades

Las bacterias poseen mecanismos de patogenicidad específicos que emergen al superar las defensas de un hospedador. Los conceptos clásicos de patogenicidad y virulencia bacteriana han proporcionado un modelo útil para analizar el papel de los microorganismos en la producción y desarrollo de las enfermedades infecciosas. Las bacterias patógenas poseen distintas propiedades que las capacitan para asegurar su establecimiento dentro de un hospedero específico. Los mecanismos por los cuales las bacterias producen enfermedad se dividen en dos categorías: factores que promueven la colonización e invasión del hospedero y aquellos que causan daño al hospedero.

A los fines didácticos, las estrategias y factores de virulencia generales involucrados en los mecanismos de invasión en bacterias patógenas pueden agruparse en dos fases: temprana y tardía (Tabla 5).

Tabla 5. Mecanismos de invasión en bacterias patógenas: fases temprana y tardía

Fase	Estrategia	Factor de virulencia
Temprana	Adherencia	Adhesinas fimbriales y no fimbriales
	Movilidad y quimiotaxis	Flagelos, fimbrias
	Invasión por disparo o cierre:	Sistema de secreción tipo III, jeringas moleculares efectores de mimetismo molecular
	Sobrevivencia intracelular	Sideróforos. Efectores de mimetismo molecular
Tardía	Movilidad intracelular	Efectores de escape vacuolar y de unión a componentes del citoesqueleto
	Evasión de respuesta inmune y variación antigénica	Cápsula, modificación de la envoltura celular, proteínas similares a inmunoglobulinas. Alteración y/o ausencia de presentación inmunológica

Factores de virulencia en leptospira

La movilidad bacteriana ocupa el mayor papel en el desarrollo de la leptospirosis. La habilidad para avanzar rápidamente en ambientes desfavorables contribuye a la entrada de las espiroquetas a través de las células epiteliales (Figura 4).

Las espiroquetas, incluyendo las bacterias del género *Leptospira*, poseen una membrana citoplasmática y una membrana externa compleja donde se han logrado determinar proteínas de la membrana externa (OMP, por sus siglas en inglés Outer Membrane Proteins) que desempeñarían un papel importante en la patogénesis de la enfermedad participando en los mecanismos de evasión de la respuesta inmune y, por ende, de la persistencia de las espiroquetas en el hospedador.

En la representación esquemática de la célula leptospira de la figura 11 se puede observar el cilindro protoplásmico (PC) que contiene el nucleoide, el peptidoglicano (PG) estrechamente unido a la membrana interna (MI), el endoflagelo (F) responsable de la movilidad bacteriana que se encuentra en espacio periplásmico (PS) y la membrana externa (MO) que exhibe diversas OMPs, con reconocida intervención en la virulencia.

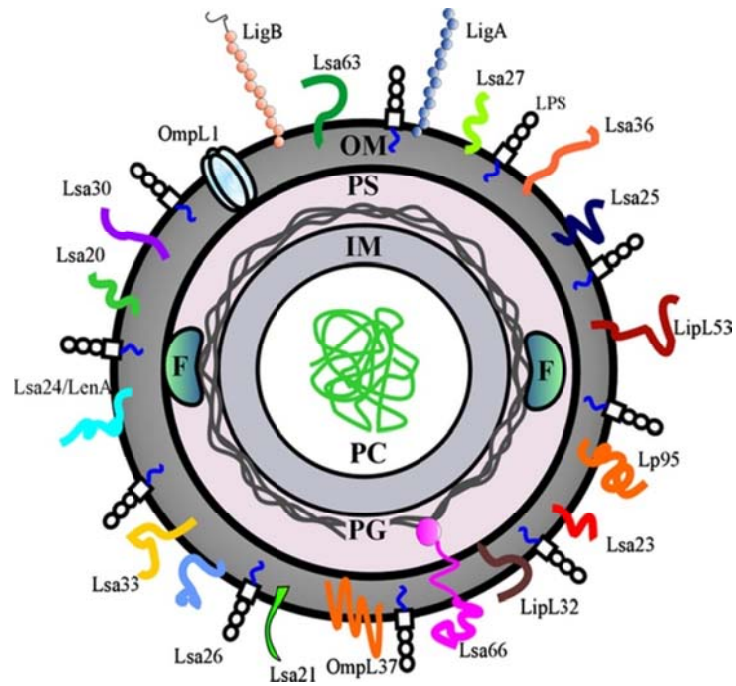


Figura 12. Representación esquemática de un corte transversal de la célula leptospira.

Fuente: FEMS MicrobiolLett 352 (2014) 129–139

Con una localización estratégica estas OMPs actúan como adhesinas, puntos de fijación de los anticuerpos, porinas, receptores para proteínas solubles como los sideróforos y proteínas del complemento (Figura 12). Con la idea de identificarlas como marcadores moleculares de patogenicidad se han logrado determinar tres tipos OMPs: transmembranales, lipoproteínas y proteínas periféricas de la membrana (Tabla 6).

Tabla 6. Leptospira: factores de virulencia: proteínas de la membrana externa (OMPs)

Tipo de OMPs	Identificación	Estructura
Proteína transmembranal	OmpL1	Proteína de 31 kDa, contiene por lo menos diez segmentos transmembranales anfipáticos β y canales de porinas en la bicapa lipídica. Su función es permitir la difusión de solutos hidrofílicos a través de la membrana externa hacia el periplasma. Como se encuentra en todas las cepas patógenas de <i>Leptospira</i> , y está ausente en las cepas saprofitas resulta un antígeno específico para el desarrollo de vacunas y diagnóstico serológico de leptospirosis, La expresión de la proteína OmpL1 es controlada por los genes ompL1/1, ompL1/2 y ompL1/3.
Lipoproteínas	LipL32	Lipoproteína de 26,7 kDa, se encuentra de forma abundante en la superficie de la membrana externa y también en la membrana citoplasmática de la bacteria anclada a la membrana externa. Se considera que promueve la hemólisis mediada por esfingomielinasa SphH, por lo que también se conoce como Hap-1 (Proteína asociada con hemólisis). El gen que codifica la lipoproteína lipL32 está presente únicamente en las especies de <i>leptospira</i> patógenas con un alto grado de conservación siendo uno de los blancos principales de la respuesta inmune. Dada la manera en que estas proteínas se asocian con la membrana podrían inducir una respuesta inmune protectora.
	LipL21	Segunda proteína en preponderancia relativa en la superficie celular en cepas patógenas; induce Ac específicos otorgando una buena respuesta antigénica en la inmunización.
	LipL41	Lipoproteína de 41 kDa que se expresa en la superficie de las membranas interna y externa, junto con OmpL1 son excelentes candidatos para el desarrollo de vacunas; no ejercen protección cuando se encuentran independientes.
Proteínas periféricas de la membrana Similares a inmunoglobulinas Adhesinas no fimbriales	Lig	Expuestas en la superficie, sólo presentes en las especies patógenas enlazan la fibronectina y su expresión es regulada bajo condiciones de osmolaridad fisiológica; su expresión se pierde en los subcultivos, con la consiguiente pérdida de la virulencia. Se han descrito LigA, LigB y LigC:
	LigA	Tiene un peso molecular de 130 kDa; recombinante utilizada como vacuna confiere inmunoprotección contra una dosis letal de <i>Leptospira interrogans</i> serovar Pomona con el hámster como modelo experimental.
	LigB	Con un peso molecular de 212 kDa, se ha propuesto para ser utilizada como antígeno en vacunas recombinantes debido a que se reveló su protección con una mayor tasa de supervivencia y una reducción en las lesiones histopatológicas de órganos vitales de hámster..

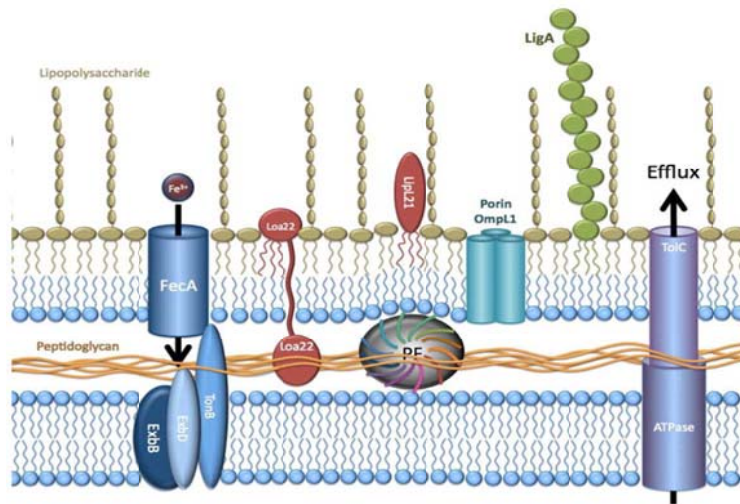


Figura 13 . Modelo de la arquitectura de membrana de *L. interrogans*

La membrana externa con lipopolisacáridos, proteínas de transmembrana como OmpL1, lipoproteínas como LipL21 y adhesinas como Lig A; la proteína Loq22 ubicada desde la cara interna de la membrana externa. En el espacio periplásmico se observan los flagelos periplásmicos (PF) junto al peptidoglicano sobre la membrana plasmática. Fuente: David A Haake, Wolfram R Zückert .The leptospiral outer membrane. Curr Top Microbiol Immunol 2015 ;387:187-221

Inmunidad en leptospirosis

Inmunidad Innata

Frente a la invasión de agentes extraños, el organismo activa los sistemas de inmunidad innatos y adaptativos. Durante la infección se establece una relación entre el patógeno y el hospedador. El poder patógeno es la capacidad que tiene el microorganismo de producir daño y son los mecanismos de la inmunidad innata los que tratan de limitar el poder patógeno para evitar la evolución de la infección. Sin embargo, cuando esos mecanismos no son suficientes se pone de manifiesto otra importante característica del microorganismo que es su poder inmunogénico, la capacidad para generar una respuesta inmune adaptativa. Esta respuesta consiste en la "adaptación" al patógeno, en el sentido de "adaptar" los receptores de la inmunidad adaptativa para el reconocimiento de epítopes en forma específica en un segundo contacto, al grado de reconocer diferencias puntuales en una secuencia de aminoácidos en el caso de las proteínas.

La inmunidad innata es inmediata, aparece entre las 0 a 4 h de producido el contacto con el agente extraño. Los receptores no específicos, ubicados en las células involucradas en la respuesta inmune

Las leptospiras, que penetran a través de la piel erosionada o las mucosas sanas y de la piel intacta después de una inmersión prolongada en agua, difunden con rapidez y transcurridas las primeras 48 h pueden alcanzar todos los humores y tejidos, con una localización especial en riñón, hígado, corazón y músculos pudiendo afectar líquido cefalorraquídeo (LCR) y ojos.

En la puerta de entrada son reconocidas por las células del sistema inmune innato, reconocen estructuras características de los diferentes grupos de patógenos denominados

patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a través de receptores celulares denominados PRR por su sigla en inglés de receptores de reconocimiento de patrones.

Durante las primeras horas de una infección, luego de atravesar la piel o mucosas sana o con soluciones de continuidad y, en contacto con proteínas séricas, como el C3 del sistema del complemento, son reconocidos por la vía alterna que representa uno de los mecanismos efectores más importantes del sistema inmune innato. Este mecanismo se ve claramente con *L. biflexa* que muere en pocos minutos en presencia de suero normal humano (no inmune). Las especies patogénicas virulentas de *Leptospira* pueden resistir la acción lítica del sistema de complemento y evadir la fagocitosis. Uno de los mecanismos es fijar en su superficie proteínas inhibitoras del complemento, como Factor H y la glicoproteína plasmática C4BP (proteína fijadora de C4, por su sigla en inglés). Se ha determinado la presencia de varias proteínas capaces de fijar otras proteínas del hospedador para evitar ser reconocidos por los efectores del sistema inmune. Un ejemplo es la proteína de superficie LipL32, proteína más expresada, altamente conservada y presente en todas las leptospiras patogénicas, capaz de unirse a la fibronectina, colágeno y laminina.

A diferencia de otras gramnegativas, el lipopolisacárido (LPS) de leptospira presenta una composición del lípido A diferente, haciéndolo menos reactivo. Este PAMP y su interacción con los TLRs se estudió en humanos y en ratón y, en el reconocimiento, están involucrado tanto el TLR2 como el TLR4. A través de estos PRRs los macrófagos se activan, el reconocimiento de LPS como de hemolisinas en las etapas tempranas de la inflamación desencadenan la activación del factor nuclear NF- κ B, que inducen la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) alfa y citoquinas pro-inflamatorias (IL1, IL-6, IL-8).

El hierro es un factor de crecimiento determinante para las leptospiras, aunque no se ha detectado la presencia de sideróforos, se han determinado diferentes proteínas capaces de recuperar hierro desde la hemoglobina por ej. enzima oxidasa Hemo.

Aunque se desconoce el rol específico de los polimorfonucleares en la protección contra la leptospira, se sabe que los neutrófilos en bovinos, producen 2 péptidos antimicrobianos Bac5 o catelicidina-2 y Bac7 catelicidina 7 capaces matar a la leptospira. La expresión de catalasa puede contribuir a la supervivencia de la leptospira una vez fagocitada.

Las cepas virulentas se caracterizan por inducir apoptosis de los macrófagos y limitar la fusión del lisosoma con el fagosoma cargados de bacterias.

Inmunidad adaptativa

Una vez que las células dendríticas reconocen a la leptospira y la endocitan para su procesamiento, cambian fenotípicamente de células inmaduras, especializadas en reconocer y en fagocitar, a células maduras que comienzan la migración hacia los órganos linfáticos secundarios. En este viaje tiene dos grandes tareas, 1- procesar el antígeno por distintas vías de procesamiento: vía exógena, vía endógena y vía del CD1; 2- la síntesis de proteínas con función inmune como: moléculas de co-estimulo, moléculas del complejo mayor de

histocompatibilidad y citoquinas. La función de las células dendríticas maduras es llegar a la zona T de los órganos linfáticos secundarios y presentar a los linfocitos vírgenes, en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad, péptidos antigénicos específicos producto del procesamiento. Los LT reconocerán específicamente a su péptido a través del complejo TCR y así se activan: se diferencian y proliferan en efectores. Los LT parecen no tener un rol importante en la protección contra la leptospirosis. Teniendo en cuenta la respuesta humoral podemos decir que los LT CD4 colaboradores foliculares son de vital importancia para la respuesta eficaz contra este patógeno de vida extracelular.

Los linfocitos B, también ubicados en los órganos linfáticos secundarios pero en los folículos, reconocen a través de su BCR epitopes específicos de los antígenos de la leptospira. El LPS representa un antígeno timo independiente, y de hecho, el desarrollo de anticuerpo anti LPS en los primeros días de infección, a altas concentraciones de IgM, se cree que es clave en muchas especies animales para la protección inmune contra la infección con varios serovares de *Leptospira*.

La producción de inmunoglobulinas IgM e IgG son específicas de serovar. Los anticuerpos contra leptospira propician la fagocitosis y la lisis por complemento. Aunque la producción de IgG al inicio es inconstante, resulta fundamental en el diagnóstico de la leptospirosis ya que el Test de aglutinación microscópica o MAT (del inglés, *microscopic agglutination test*), prueba de diagnóstico serológico de referencia, detecta principalmente IgG a partir de los 5 a 7 días post-infección, título que permanece por meses o años. La respuesta específica contra el serovar infectante se completa con la producción de interferón gama (IFN γ) en hígado/riñón y la asociación a células T4 (CD4+) y T. Si bien esto genera una inflamación que atrae a los leucocitos para matar a las bacterias las leptospiras ha desarrollado mecanismos de evasión de la respuesta inmune que le permiten llegar y colonizar tejidos de órganos distantes como pulmón, hígado, riñón y bazo. La severidad del cuadro clínico depende de las características de la serovariante involucrada.

Con la aparición de los anticuerpos en el suero, la leptospiremia se reduce y las leptospiras son eliminadas por fagocitosis en los órganos internos, a excepción del riñón donde sobreviven. En ausencia de anticuerpos específicos no son fagocitadas ni destruidas por macrófagos o PMN.

El sitio anatómico de predilección son los túbulos renales proximales, donde pueden permanecer después de una infección aguda en humanos y de forma intermitente por años en animales.

Patogenia y manifestaciones clínicas

La presencia de la enfermedad, sus manifestaciones y la evolución futura va a estar condicionada por factores del hospedador (especie, edad, sexo, estado nutricional, susceptibilidad, grado de inmunidad), del agente (serovar, dosis infectante, virulencia de la cepa) y del medio (temperatura, humedad, ecosistema).

La leptospirosis tiene un periodo de incubación de 7 a 14 días, con un rango que va de 2 a 30 días. Se caracteriza por presentar un amplio espectro de manifestaciones clínicas. Durante la fase aguda, la enfermedad puede ser asintomática o subclínica y sintomática, anictérica o ictérica.

En el hombre la enfermedad puede ser asintomática o puede cursar con un cuadro febril usualmente bifásica con sintomatología inespecífica, que puede durar entre cinco a diez días. Los síntomas iniciales característicos además de fiebre de tres a diez o más días de presentación, incluyen cefalea, escalofríos, vómito, mialgias generalizadas, inyección conjuntival, malestar y a veces postración. La primera fase bacterémica se denomina leptospiremia, ya que la leptospira se distribuye por todo el organismo y se puede encontrar en sangre. La segunda fase, es la inmune, en la cual se pueden detectar anticuerpos en suero, la bacteria ya no se encuentra en sangre y se inicia la eliminación de ésta por orina. En la forma icterohemorrágica se presenta falla multiorgánica, colapso cardiovascular, shock séptico, vasculitis, hemorragia pulmonar y muerte (Figura 13).

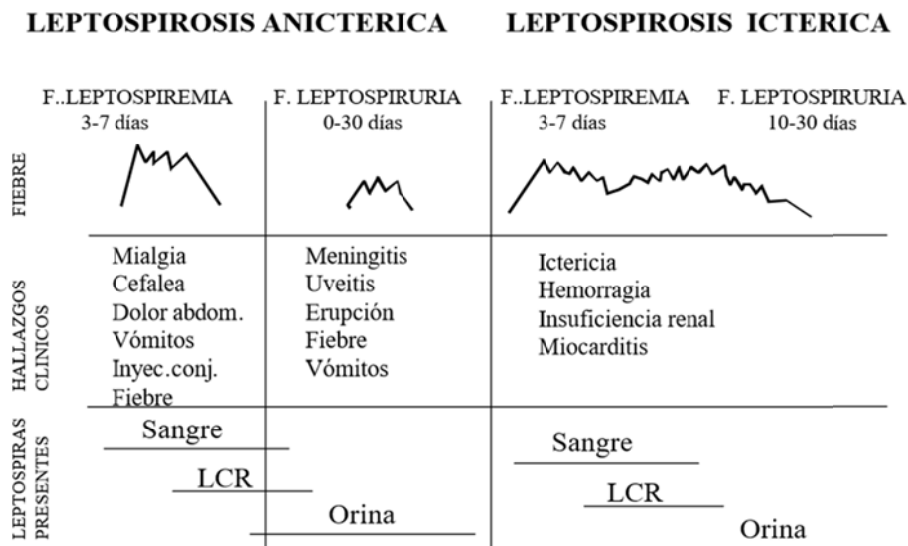


Figura 14. Fases clínicas de la leptospirosis.

Las lesiones celulares de los diversos órganos tienen como base patogénica los mismos factores que actúan inicialmente sobre la membrana celular, adicionada a una eventual hipoxemia derivada del daño vascular (Figura 15).

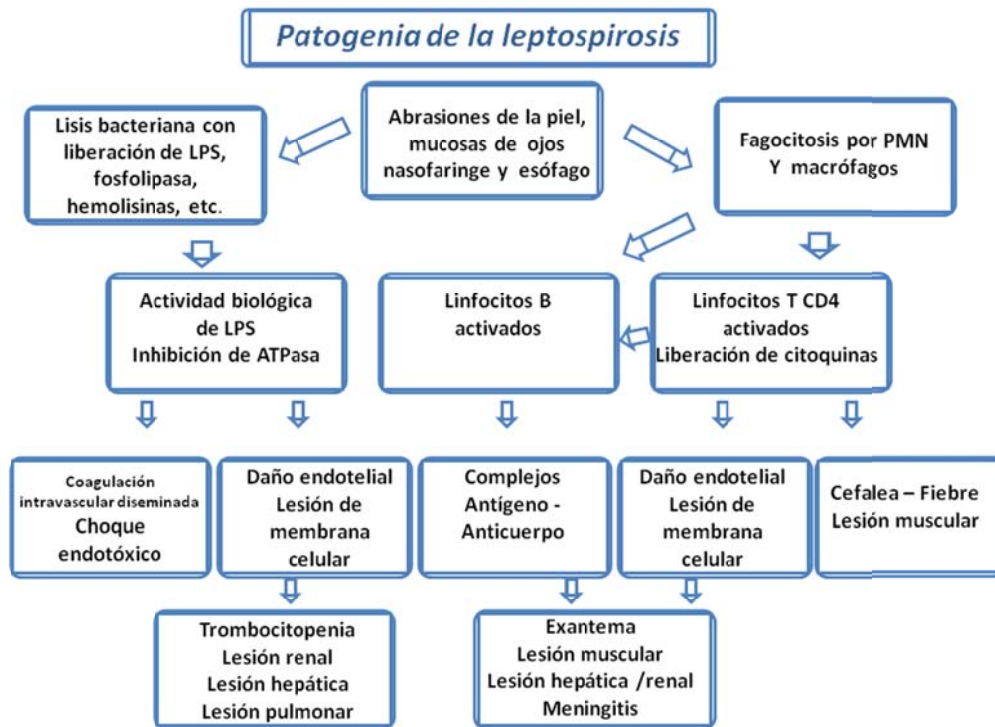


Figura 15. Patogenia de la leptospirosis.

La respuesta inmune (formación de inmunocomplejos, liberación de citoquinas y vasculitis autoinmune) está implicada en la patogénesis de la leptospirosis, en consecuencia los signos y síntomas de compromiso pulmonar, renal y hepático, aparecen en la fase inmune cuando las inmunoglobulinas específicas comienzan a detectarse.

La leptospirosis en los animales puede manifestarse de forma subclínica o clínica y, en esta última, presentar un carácter desde leve hasta letal. La forma subclínica es frecuente en los roedores y otras especies salvajes y, entre las especies domésticas, en los cerdos y bovinos no preñados ni en lactación. En el hígado puede observarse necrosis centrilobular; la ictericia ocurre como resultado de la hemólisis y la disfunción hepatocelular. Las leptospiras invaden también el músculo esquelético, causando edema, vacuolización de las miofibrillas y necrosis focal con alteración de la microcirculación muscular, aumento de la permeabilidad capilar con hipovolemia y salida de fluido. En el tejido placentario de hembras preñadas, puede encontrarse necrosis, depósito de material fibrinoide y tromboembolismo en senos y vasos sanguíneos. En pequeñas arterias puede observarse arteritis fibrinoide con coagulación intravascular diseminada; en grandes arterias, infiltración de macrófagos y degeneración vacuolar.

Diagnóstico

El diagnóstico es una de las herramientas indispensables para la lucha y el control de enfermedades infecciosas. Para un correcto diagnóstico de la enfermedad debe utilizarse la combinación de parámetros epidemiológicos y clínicos que tienen apoyo en el diagnóstico de laboratorio microbiológico y serología.

Para leptospirosis humana, la Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud de la Nación-Sistema de Vigilancia Laboratorial (SIVILA -SNVS) establece en el último documento Leptospirosis: Normativa y tutorial para vigilancia (2013) las clasificaciones de caso pertinentes para la correcta interpretación de los resultados aportados por los laboratorios a así como el modo de transmisión de la enfermedad.

Se emplean de forma rutinaria para el diagnóstico de leptospirosis en el laboratorio las técnicas serológicas (indirectas) y como procedimientos confirmatorios se pueden emplear técnicas bacteriológicas (directas) para aislamiento o detección del microorganismo (Tabla 10).

Tabla10. Diagnóstico de leptospirosis en el laboratorio

Diagnóstico	pone en evidencia	Técnica
Directo Bacteriológico (confirmativo)	en tejidos animales o en líquidos corporales leptospiras antígenos de leptospiras ácidos nucleicos de leptospiras	Aislamiento Demostración microscópica Demostración de antígenos Métodos moleculares: PCR
Indirecto Serológico	en suero del paciente: anticuerpos	Macro aglutinación (TR) Elisa Micro aglutinación

En cuanto al aislamiento del microorganismo, durante la fase leptospirémica se lo puede obtener de sangre (hemocultivo), LCR, leche y prácticamente de cualquier órgano. A partir de la aparición de respuesta inmunológica se debe buscar en riñón y por consiguiente en orina (se elimina intermitentemente por un período variable), en aparato genital femenino y fetos (abortados o no).

La detección de anticuerpos en sangre será positiva a partir del décimo día aproximadamente y, si se toman 2 muestras con un intervalo de 15-20 días, será posible observar una seroconversión con aumento del título de anticuerpos en 2 o más diluciones (Ej: 1/200 a 1/800 o más). Este hecho es característico de la fase aguda. Posteriormente, la concentración de anticuerpos en sangre comienza a declinar lentamente a un ritmo variable y pueden no observarse variaciones del título entre muestras obtenidas con 2 meses de diferencia; de ahí que la serología en la etapa crónica tenga poco valor diagnóstico (indica que hubo contacto con el agente, pudiendo esto deberse a una vacunación, infección persistente, etc.) (Tabla 12).

Tratamiento

Se encuentra dirigido principalmente a realizar una terapia de soporte, corrección del desequilibrio hidroelectrolítico y ácido-básico, sobre todo en las formas graves del padecimiento. El tratamiento antimicrobiano se debe iniciar lo más temprano posible, con un diagnóstico presuntivo y sin esperar la confirmación por laboratorio, ya que se encuentra orientado a controlar la infección antes de que se presente daño irreparable en el organismo, sobre todo en riñón e hígado y el desenlace sea fatal.

Control y prevención

La profilaxis higiénico-sanitaria es esencial en el control de la leptospirosis en una población humana y animal, pero siempre formando parte de un sistema general de control, junto con la vacunación y el tratamiento, ya que ninguna de estas medidas es eficaz por separado. Las medidas adecuadas comprenden la desratización, la promoción de la higiene domiciliaria y comunitaria, el cumplimiento de condiciones higiénicas para la crianza de animales domésticos para el autoconsumo, especialmente de cerdos y en la tenencia de perros u otras especies, así como el conocimiento del destino de los residuales pecuarios, en especial de los que se vierten en terrenos bajos, ríos, arroyos, zanjas, lagunas y presas, y el estudio, profilaxis y control oportuno de los principales reservorios animales de leptospiras. Las vacunas (bacterinas) pueden usarse en bovinos, porcinos y caninos.

Referencias

- Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and Leptospirosis. *Veterinary Microbiology*. 2010; 140: 287-96.
- Adler B, y de la Peña Moctezuma A. *Leptospira*. En: Gyles C L, Prescott J F, Songer J G, y Thoen C O. 2010. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Iowa, USA Blackwell Publishing. Fourth Edition, pp. 527-541.
- Adler B, 2015. *Leptospira* and Leptospirosis. New York Published by Springer.
- Arias D, Arauz S, Stornelli A, Stanchi N, Renner E, Martino P, Gatti M. Comparación de cuatro antígenos para la determinación de anticuerpos antileptopiras en serología por ensayo inmuno enzimático (ELISA) en leptospirosis canina”. *Revista Biomédica (México)*. 10,3:167-172, 1999. ISSN:2007-8447. Disponible en:<http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb991035.pdf>
- Céspedes M. Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Reemergente. *Rev Perú MedExp Salud Pública*. 2005; 22(4):290-307.
- Chavarría Joya L, Gutiérrez D L, Méndez Hurtado W, Moscoso Gama. *Leptospira*: revisión del agente causal de una enfermedad zoonótica *Biociencias* 2015; 10 (2) 65-80
- Comisión Científica sobre leptospirosis en la República Argentina. Informe sobre leptospirosis en la República Argentina. Fundación Mundo Sano. Serie Enfermedades Transmisibles. Publicación Monográfica 3. 34 p. 2002
- Dietrich M, Mühldorfer K, Tortosa P, Markotter W. *Leptospira* and Bats: Story of an Emerging Friendship. *PLoS Pathog* 2015; 11(11): e1005176. doi:10.1371/journal.ppat.1005176
- Ellis W A Leptospirosis 2014 En: Manual de animales terrestres. OIE, Office International des Epizooties (OIE) 7ª edición 2016. Tomos 1 Parte 2. Disponible en:http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.12_Leptospirosis.pdf [fecha de acceso: 23 de septiembre 2016].
- Faine S, Stallman ND. Amended descriptions of the genus *Leptospira* Noguchi 1917 and the species *L. interrogans* (Stimson 1907) Wenyon 1926 and *L. biflexa* (Wolbach and Binger 1914) Noguchi 1918. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1982.32:461-463
- Faine, S. Guidelines for the control of leptospirosis. World Health Organization, Geneva, Switzerland; 1982. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat, P. 1999. *Leptospira* and leptospirosis. Medisci, Melbourne.
- Gatti E, Arias D, Rossetti S, Selva S, Copes J, Laplace R, Martino P, Lelicer K, Stanchi N. Investigación de Leptospiras en aguas de lagos del Zoológico de La Plata. Argentina. *Analecta Veterinaria* 2004; 24 (1): 18-20.

- Haake D A, Zückert W R. The leptospiral outer membrane. *Curr Top Microbiol Immunol* 2015;387:187-221
- Linzitto O, Stanchi N, Gatti M, Passaro D, Sonsini A, Brihuega B, Tunes M, Del Curto B, Martín L. Manual *Leptospira* y Leptospirosis en Argentina. Edición 2014 digital ISBN 978-987-33-5783-1.
- Ministerio de Salud de la Nación. Red de Laboratorios de Leptospirosis y Laboratorio Nacional de Referencia INER-ANLIS. En: Programa Nacional de Control de Enfermedades Zoonóticas y el área de Vigilancia de la Dirección de Epidemiología. 2014 . Leptospirosis - Algoritmo de diagnóstico por laboratorio y notificación a través del SIVILA. Buenos Aires. Disponible en: http://www.msal.gov.ar/images/stories/epidemiologia/vigilancia/sivila/tutoriales/15-08-2014-algoritmos_de_diagnostico_y_notificacion_leptospirosis.pdf [fecha de acceso: 30 de septiembre 2016].
- Ministerio de Salud de la Nación. Dirección de Epidemiología. Leptospirosis. 2014. *Guía para el equipo de salud* Nro9. ISSN 1852-219X (en línea). Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000489cnt-guia-medica-leptospirosis.pdf> [fecha de acceso: 30 de septiembre 2016].
- Ministerio de Salud de la Nación. Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud - SNVS -C2/. Boletín Integrado de Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud - SNVS -C2/SIVILA. 2016; N° 329–SE 39-216 | 124-80.
- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. 5ta ed. St. Louis: Mosby; 2007.
- Murray GL. The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. *Veterinary Microbiology*. 2013;162(2-4):305-14.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) *Leptospirosis Humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control*. 2008. Traducción del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa –VP/OPS/OMS,..
- Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med. Mal Infect.* 2013; 43(1):1–9.
- Seijo A, Draghi G, Dorta de Mazzonelli G, Mazzonelli J y colaboradores de la CCLA (2002). Informe sobre leptospirosis en la República Argentina. Fundación Mundo Sano, Bs As. Serie Enfermedades Transmisibles, publicación monográfica 3.
- Seguro A C, Andrade L. Pathophysiology of leptospirosis. *Shock* 2013; 39(7) 17-23.
- Zuerner RL Family IV. *Leptospiraceae*. In: Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund B, Paster BJ, Ward N, Ludwig W and Whitman WB, 2010. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Edition. New York Published by Springer. pp 546–563.

CAPÍTULO 11

Moraxela

Raúl O. Cerdá

Moraxella es el género tipo de la familia *Moraxellaceae* de la clase Protobacteria, en el cual se describieron 20 especies; 11 se aislaron de animales, sanos o enfermos. De las 5 especies de *Moraxella* aisladas de animales enfermos, *M. bovis* es la mejor estudiada en cuanto a sus mecanismos de patogenicidad. Una especie relativamente nueva, *M. bovoculi*, se aisló de bovinos de leche y de carne con signos de queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB) en California, Estados Unidos, en 2002.

Tabla 1. Especies de *Moraxella* aisladas de animales

Especies de <i>Moraxella</i>	Animal
<i>M. bovis</i>	Bovino: QIB ¹
<i>M. bovoculi</i>	Bovinos con QIB
<i>M. ovis</i>	Ovejas con conjuntivitis
<i>M. ablonga</i>	Cavidad oral de ovejas
<i>M. canis</i>	Bozales de perros y gatos
<i>M. bovrei</i>	Fluidos nasales de cabras sanas
<i>M. caprae</i>	Fluidos nasales de cabras sanas
<i>M. caviae</i>	Faringe de cobayos sanos
<i>M. cuniculi</i>	Nasofaringe de conejos
<i>M. equi</i>	Caballos con conjuntivitis
<i>M. anatipestifer</i>	Patos con septicemia

QIB: queratoconjuntivitis infecciosa bovina.

Difusión en el ambiente y transmisión

Las moraxelas son agentes exclusivos de infecciones oculares del hombre y de los animales y se encuentran ampliamente distribuidos alrededor del mundo. *Moraxella bovis* afecta fundamentalmente a los bovinos, siendo las moscas de la cara (*Musca autumnalis*) la principal fuente de transmisión de estas bacterias. Estos insectos constituyen una plaga para el ganado en pastoreo, pero no así para los confinados en *feedlots* y se presentan normalmente en grandes cantidades alrededor de los ojos y la boca de los animales. Las pequeñas espículas rugosas presentes en la boca de estas moscas causan una gran irritación y lesiones mecánicas sobre los tejidos del hospedador favoreciendo la infección por *M. bovis* y otros microorganismos. También desempeñan un papel importante en la transmisión los bovinos enfermos y curados, siendo portadores y reservorios hasta el año siguiente de haber contraído la enfermedad.

Morfología y fisiología

Las moraxelas son bacterias gramnegativas con forma de bacilo corto, cocobacilo o como en el caso de *M. catarrhalis* en humanos, cocos asociados en parejas (diplococos) o incluso en pequeñas cadenas, por lo que suelen confundirse con *Neisseria*. Es bastante frecuente observar variaciones de tamaño celular, de morfología y aún de la producción de elementos filamentosos y cadenas, en función de las condiciones de cultivo. El pleomorfismo puede ser estimulado por disminución del tenor de oxígeno y por incubación a temperaturas subóptimas. Son microorganismos inmóviles, no esporulados, con características de oxidasa y catalasa positiva. Algunas especies son hemolíticas y algunas capsuladas. Son bacterias aerobias aunque pueden crecer escasamente en anaerobiosis y no son muy hábiles para fermentar los hidratos de carbono. La mayoría de las especies de *Moraxella* tienen exigencias nutricionales y desarrollan mejor en agar sangre y aún más en medios con suero a 36-37 °C. En agar sangre se observa alrededor de las colonias de las cepas hemolíticas una zona estrecha de beta hemólisis, entre las 24 y 48 horas de incubación. Las colonias desarrolladas en este medio de cultivo son pigmentadas, friables, redondas, traslúcidas, gris blanquecinas y a medida que el medio envejece el centro de la colonia se eleva. En los caldos de cultivo crece con presentación de ligero enturbiamiento y con formación de un grueso sedimento.

Órganos que afectan y patologías provocadas

El único órgano afectado por estas bacterias es el ojo. *M. bovis* es el agente causal de la querato-conjuntivitis infecciosa en el ganado bovino (QIB), fundamentalmente en los terneros, también conocida como “*pink eye*” u ojo rosado. La especie más importante y representativa en humanos es la *M. lacunata*, causante ocasional de conjuntivitis sub-aguda o crónica y queratitis.

Factores de virulencia de *M. bovis*

Fosfolipasa B

En el año 2001, se describió la existencia de una proteína secretoria de 66kDa con actividad de fosfolipasa B. Actualmente se conoce que dicha proteína designada como PLB y codificada por el gen *plb*, pertenece a la familia de proteínas lipolíticas GDSL (Gly-Asp-Ser-Leu). Si bien aún no se probó que sea un elemento clave en la patogénesis de *M. bovis*, pareciera que las PLB están involucradas en ésta y podrían ser consideradas como buenos antígenos candidatos a ser incluidos en vacunas a subunidades de QIB.

Captación de hierro y expresión de proteínas

En trabajos que estudiaron el mecanismo de captación de hierro por parte de *M. bovis*, se demostró la presencia de proteínas-liagas a transferrina 1 y 2 (Tbp1 y Tbp2) presentes en la membrana; esas proteínas eran específicas para bovinos pero no para ovinos y caprinos. En trabajos posteriores se identificaron proteínas de ligado codificadas en los genes A y B (*tbpa1* y *tbpa2*) así como también proteínas-ligadas a lactoferrina (LBP) codificadas en los genes A y B (*lbpA* y *lbpB*). Basados en estudios realizados con *M. catarrhalis* acerca de la acción bactericida observada en antisueros de conejo contra LBPs, se postuló la posibilidad de emplear estas proteínas como antígenos candidatos en la producción de vacunas contra QIB.

Considerando que en *M. bovis* la expresión de las proteínas es inducida en respuesta a concentraciones bajas de hierro ambiental, deben existir mecanismos de regulación para dicha respuesta. Uno de esos mecanismos fue esclarecido en 2003 cuando un gen homólogo de la regulación de la captación de hierro (*fur*) de *M. bovis* fue identificado, clonado y caracterizado. La expresión de dicho gen decrecía cuando el hierro estaba disponible. También se observó la unión de Fur a fragmentos de ADN *upstream* del gen *fur*. Una proteína represora de 79kDa designada IrpA es regulada negativamente por Fur; cepas IrpA deficientes tienen habilidad reducida para crecer en condiciones donde la fuente de hierro es transferrina o lactoferrina bovina.

Hemaglutinina filamentosa

Dos grandes marcos de lectura abiertos (ORFs) designados como flpA y flpB fueron recientemente reportados en un plásmido de 44kb, pMBO-1, en la cepa Epp63 de *M. bovis* y que codifica proteínas que tienen homología con hemaglutininas filamentosas de *Bordetella pertussis* (FHA), la cual permite a dicha bacteria su adherencia a superficies de mucosas. Un ORF adicional posiblemente involucrado en la secreción de hemaglutininas filamentosas putativas fue también reportado en el mismo plásmido.

Se considera que otras proteínas, además de los pilis, juegan un rol importante en la patogenia de *M. bovis*. Por ejemplo, se demostró que cepas sin pilis pueden adherirse, si bien no tan eficientemente como las que los presentan, a superficies de varios tipos de células, lo cual indicaría un importante rol como adhesinas.

Pili

Una característica necesaria para la patogénesis de *M. bovis* es la expresión de pilis, proyecciones de la superficie celular compuestas de subunidades repetitivas individuales de proteína pilina. Es común observar la falta de expresión de pilis en el laboratorio luego de pasajes sucesivos en medios de cultivo, dando esto origen a cepas lisas. Los pilis de *M. bovis* son filamentos rectos sin ramificaciones de 6,5-8,5 nm distribuidos en la superficie celular de las cepas productoras de colonias rugosas y ausentes en las lisas. Las cepas con pilis se adhieren mejor a las superficies celulares de varios tejidos bovinos, que las que no los presentan. La importancia de los pilis en la patogénesis de *M. bovis* se demostró en muchos trabajos *in vivo*: la cepa con pili Epp63 induce la producción de QIB mientras que las cepas que no los tienen son incapaces de hacerlo. Del mismo modo, las vacunas producidas con cepas con pilis protegen contra la QIB en desafíos experimentales.

A partir de un extenso estudio realizado en el año 1991, empleando técnicas de ELISA, aglutinación e inmunolectroferesis, se pudieron identificar 7 serogrupos en cepas con pilis designados de la A a la G. Teniendo en cuenta esta característica, es común observar falta de eficacia en las vacunas aplicadas a rodeos donde los serogrupos presentes no se corresponden con los vacunales. Adicionalmente a las diferencias de serogrupo, existe un elemento de diversidad importante entre las distintas cepas relacionado a dos diferencias de fases de pilina que pueden ser expresadas: pilis I (previamente conocida como formas α) y pilis Q (conocida previamente como formas β); estas dos formas diferentes resultan de la inversión de una región de 2kb en el ADN. Cuando las formas I y Q fueron estudiadas en la cepa Epp63 para determinar diferencias en infectividad, las cepas pili Q fueron encontradas como más infectivas que las pili I. Se observaron cambios entre ambas formas *in vivo* lo cual condujo a la conclusión que las formas Q son importantes en la colonización de la córnea mientras que las I están involucradas en el mantenimiento y establecimiento de la infección. Tal intercambio sería importante en los mecanismos de evasión de la respuesta inmune por parte de *M. bovis*.

Si el intercambio de tipos de pili ocurre también en otros serogrupos, es lógico pensar que la diversidad antigénica en los tipos de pilis de *M. bovis* sea enorme. No obstante, una protección cruzada podría ser posible entre vacunas en base a pilis que incorporen antígenos que comprendan los amino-terminales de pilina lo cual es ampliamente conservado entre los distintos serogrupos.

Citotoxinas (hemolisinas/citolisinas)

Más allá de los pilis que son necesarios para la adhesión, la patogénesis de *M. bovis* también depende de la expresión de citotoxinas (hemolisina o citolisinas), las cuales poseen propiedades hemolíticas, corneotóxicas y leucotóxicas. Se observó que las cepas de *M. bovis* no hemolíticas son apatógenas para bovinos. Cuando se cultivan cepas hemolíticas en agar sangre se observa la producción de una zona franca de hemólisis β alrededor de las colonias. Cuando se exponen eritrocitos a la acción de estas hemolisinas se observa eflujo de potasio, hinchazón y lisis celular. Viendo que estos efectos pueden ser inhibidos con protectores osmóticos, se cree que las hemolisinas de *M. bovis* generan la formación de poros transmembrana en las membranas de las células blanco. Los bovinos recuperados de la QIB poseen anticuerpos contra las hemolisinas y pueden neutralizar hemolisinas de varios tipos de cepas de *M. bovis*. Por otra parte, los bovinos vacunados con estas hemolisinas desarrollan protección contra cepas heterólogas de *M. bovis*. Estos estudios colaboraron en esclarecer la importancia de estas citotoxinas en la patogénesis de *M. bovis* así como también a considerarlas para ser incluidas en las vacunas para la protección de la QIB asociada a diversas cepas de *M. bovis*. Se postuló la posibilidad de que estas citotoxinas pertenezcan a la familia de toxinas RTX (toxinas formadoras de poros). Se describió la producción de anticuerpos monoclonales con capacidad de neutralizar la actividad hemolítica de *M. bovis*; estos anticuerpos reconocían una proteína de 94-kDa de cepas hemolíticas de *M. bovis* presente en cada uno de los diferentes serogrupos con pilis. Se describió un método para purificar y estabilizar citotoxinas de *M. bovis* a partir de sobrenadantes de cultivos. Las citotoxinas purificadas son estables hasta 4 meses a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y mostraron ser efectivas en la estimulación de protección contra la QIB.

El tratamiento de la QIB se enfoca en la administración de antibióticos en forma sistémica o local (en los párpados o en la conjuntiva). Teniendo en cuenta que *M. bovis* es sensible a muchos antimicrobianos, tanto productores como veterinarios tienen un amplio rango de opciones terapéuticas.

Muchas vacunas comerciales están disponibles en el mercado para prevenir la QIB. Del mismo modo, muchos productores emplean bacterinas autógenas producidas a partir de cepa aisladas de animales infectados. La efectividad de estas vacunas radica fundamentalmente en el momento de aplicación, siendo el ideal unos 6 a 8 meses antes de la aparición de los signos clínicos de la QIB, teniendo en cuenta el tiempo necesario para un adecuado desarrollo de la respuesta de anticuerpos protectores.

Respuesta inmune humoral durante la infección de *M. bovis*

En la secreción lagrimal normal de los bovinos, la IgA secretoria es la inmunoglobulina principal en terneros y en la QIB inducida experimentalmente las concentraciones de IgG1 e IgG2 se incrementan. En un estudio se informó la existencia de mayores títulos de IgA contra preparaciones antigénicas de *M. bovis* en terneros con presentaciones severas de QIB que en

terneros con presentaciones más leves. Un trabajo posterior reportó una respuesta predominantemente de IgG en terneros con presentación natural de QIB, pero concluyeron que los anticuerpos específicos contra *M. bovis* presentes en las secreciones lagrimales no previenen la QIB. En terneros infectados experimentalmente con *M. bovis* se observaron concentraciones en lágrimas de IgA superiores a las de IgG contra antígenos inespecíficos de *M. bovis* medidos mediante prueba de ELISA. En otro trabajo llevado a cabo en un pequeño número de terneros, tanto los anticuerpos en lágrimas (IgA secretoria) como los humorales (IgG) contra antígenos celulares enteros de *M. bovis* demostraron conferir resistencia contra la QIB del mismo modo que cuando se compara con la respuesta humoral por IgG sola. A partir de estos estudios se concluye que los anticuerpos humorales podrían reducir la duración y la severidad de los signos clínicos asociados con la QIB. Debido a que todos estos estudios se llevaron a cabo contra preparaciones antigénicas enteras o crudas de *M. bovis*, no existe una información clara y consistente respecto a los aspectos cuanti y cualitativos de la respuesta inmune que se desarrolla luego de la infección ocular por *M. bovis* y de la significancia de dicha respuesta en la protección contra la QIB.

Patogénesis

Las infecciones experimentales con *M. bovis* generan úlceras corneales, erosiones conjuntivales y acumulación de fibrina, neutrófilos y bacterias en el estroma corneal. La mayoría de los trabajos publicados sobre la patogénesis de *M. bovis* se enfocaron en aquellas proteínas que permiten al patógeno en primer lugar adherirse a la córnea y en segundo lesionar el epitelio corneal. Las principales proteínas responsables de la adhesión pertenecen al pili. Las lesiones del epitelio corneal subsecuentes a la adhesión son atribuidas a repeticiones en la citotoxina. Tanto los pilis como las citolisinas demostraron poseer roles muy claros en la patogénesis de la QIB. No obstante, *M. bovis* cuenta con una gran variedad de toxinas que si bien su relación con la patogénesis no se demostraron aún, o estudiaron tan profundamente como los pilis o las citotoxinas, podrían estar involucradas en la patogénesis de la QIB. Estas toxinas incluyen varias enzimas hidrolíticas, esterasas C4, esterasas-lipasas C8, lipasas C14, fosfoamidases, fosfatasas, leucina y valina aminopetidases y gelatinasas, fibrinolisinias, proteínas con actividad hemolítica y proteínas de citoadhesión (hemaglutinina filamentosa). Una fosfolipasa y una proteína involucrada en la captación de hierro.

Profilaxis y tratamiento

Como se mencionó, el uso de los distintos tipos de vacunas comerciales o inclusive autovacunas, son indispensables como medida profiláctica de control de la QIB. Del mismo

modo, las medidas de manejo tendientes a reducir la llegada y diseminación de *M. bovis* en los rodeos permitirán reducir el impacto de la enfermedad.

Las moraxelas son sensibles a un amplio rango de antibióticos, siendo las tetraciclinas de larga acción las de elección, ya sean de administración tópica o sistémica. La aplicación de tratamientos sintomáticos colabora en la recuperación más efectiva de los animales afectados.

Referencias

Angelos JA. Moraxella. En: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. 2010. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 4th edition. pp: 469-76.

Leardini AL. Moraxella. En: Stanchi NO. 2010. Microbiología Veterinaria. Buenos Aires; Inter-Medica, pp: 336-9.

CAPÍTULO 12

Micobacterias

Gabriel E. Travería y María F. Alvarado Pinedo

Las micobacterias patógenas causan enfermedad en humanos y animales. Un tercio de la población humana mundial se encuentra afectada por tuberculosis latente (cuando el sistema inmune reconoce la infección, se sensibiliza, confina las micobacterias sin llegar a eliminarla y el hospedador no la disemina), de este grupo el 10 % desarrollará una forma activa de la enfermedad con diseminación de bacilos. Los afectados con tuberculosis latente no manifiestan signos clínicos de la enfermedad, conviven con el riesgo de una reactivación ante una inmunosupresión transitoria o permanente. Esta situación se complica por supresiones del sistema inmune como la generada por el virus de la inmunodeficiencia humana y la presencia de micobacterias multirresistentes a las drogas utilizadas para su tratamiento. En humanos, además de la tuberculosis, otra enfermedad causada por micobacterias es la lepra; en animales, la tuberculosis y la paratuberculosis son las principales afecciones provocadas por micobacterias. La persistencia de estas infecciones a lo largo del tiempo se debe en parte a la interacción que se produce entre las bacterias, lo característico de su pared y el sistema inmune del hospedador.

Se presentarán las características de las micobacterias que se relacionan con su virulencia, metabolismo y los mecanismos de respuesta inmunológica que se desencadenan frente a este tipo de infecciones.

Clasificación

Pertenecen al orden: Actynomicetales, familia: *Mycobacteriaceae*. El género *Mycobacterium*, incluye al complejo *M. tuberculosis* y complejo *M. avium*. El primero está integrado por las especies *M. tuberculosis* (produce tuberculosis en humanos), *M. bovis* (responsable de tuberculosis en bovinos), *M. microti* (patógeno en pequeños roedores), *M. caprae* (patógeno para animales en Europa), *M. pinnipedii* (produce tuberculosis en pinípedos), *M. canettii* y *M. africanum* producen tuberculosis en humanos, principalmente en África.

El complejo *Mycobacterium avium* incluye, *M. avium* subsp.*avium*(produce tuberculosis aviar), (causa paratuberculosis en ruminantes), *M. avium* subsp.*hominissuis*(afecta a cerdos y humanos), *M. avium* subsp.*silvaticum*(afecta a las aves).

Otras micobacterias patógenas de importancia son *M. leprae* (responsable de la lepra en humanos), *M. scrofulaceum* (causa de linfadenitis cervical principalmente en niños) (Tabla 1).

Tabla 1. Vía de infección, lesiones y signos clínicos característicos de algunas enfermedades causadas por micobacterias

Micobacterias	Vías de infección	Lesión característica	Signos clínicos característicos
<i>M. tuberculosis</i>	Respiratoria	Neumonía con granulomas caseosos con compromiso de linfonodos regionales.	Pérdida de peso progresiva, tos y otros signos asociados con los órganos afectados.
<i>M. bovis</i>	Respiratoria (en adultos) y oral (en terneros)	Neumonía con granulomas caseosos con compromiso de linfonodos regionales. En terneros causa meningitis.	En bovinos adultos signos respiratorios con pérdida progresiva de estado general y muerte. En terneros cursa con signos nerviosos.
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	Oral (fecal-oral) en animales hasta el año y medio de vida.	Íleocolitis granulomatosa difusa, con lesión de linfonodos y vasos linfáticos asociados.	Diarrea acuosa intermitente a profusa, caquexia progresiva y muerte.

Formas de transmisión de las micobacterias y signos clínicos característicos

Todas las micobacterias se encuentran en el medio ambiente, presentando una sobrevivencia generalmente prolongada que es condicionada por factores como temperatura, humedad, presencia de materia orgánica, pH del suelo y radiaciones solar entre otros; por ejemplo la sobrevivencia que presenta el *M. avium* subsp.*paratuberculosis* en el medio ambiente es favorecida por el pH ácido, la presencia de hierro y de materia orgánica en el suelo; en estas condiciones y al abrigo de los rayos solares, puede llegar a sobrevivir en las heces, pasturas y silos por un período de 1 año o más. Esta capacidad de supervivencia facilita que los animales y seres humanos tomen contacto con estas bacterias habitualmente a partir de la vía respiratoria y oral. Estas infecciones cursan con un periodo de incubación prolongado; de acuerdo a las características de cada micobacteria, la edad del individuo y su estado inmunológico se podrán presentar diversos grados de lesión orgánica y distintos cuadros clínicos. En la tabla 1 se

presenta de manera resumida algunos ejemplos de las vías de infección y signología, asociada con las enfermedades causadas por micobacterias.

Morfología

Las micobacterias son bacilos aerobios obligados, no formadores de esporas, inmóviles, de un tamaño que puede variar de 1 a 10 μm , no producen toxinas y son ácido alcohol resistente por el gran contenido de lípidos en su inusual pared bacteriana. Aproximadamente un cuarto del genoma de *M. tuberculosis* codifica información referida con estructura y regulación de la pared celular.

La pared de las micobacterias es hidrofóbica y su composición varía entre las especies, se encuentra formada por compuestos similares a la cera. Por fuera de la membrana plasmática está el péptidoglicano, un complejo macromolecular formado por el ácido n-acetil murámico y la n-acetil glucosamina, que le otorga rigidez y estructura a la bacteriana. El péptidoglicano se une covalentemente por medio de uniones fosfodiéster al arabinogalactano, un heteropolisacárido formado por D-arabinosa y D-galactosa, unidos por otra unión covalente a ácidos grasos complejos llamados ácidos micólicos (Figura 1).

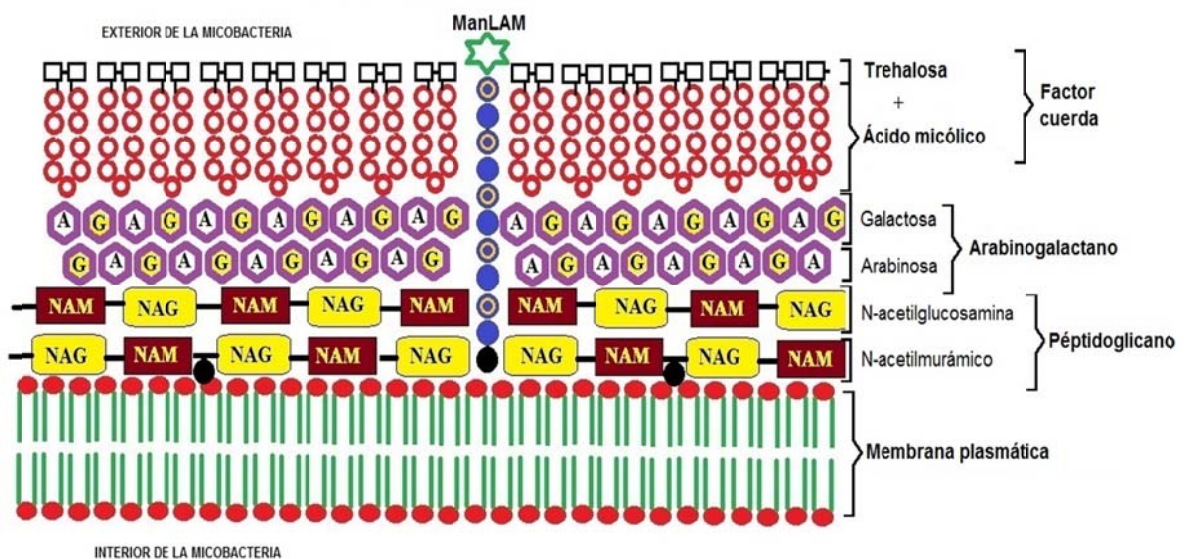


Figura 1. Constitución de la pared de las micobacteria. Desde el interior hacia el exterior de la bacteria se encuentra: membrana plasmática, péptidoglicano, arabinogalactano, ácidos micólicos y trehalosa. ManLAM (lipoarabinomano unido a manosa).

Lipoarabinomano

El fosfatidilinositol (PI) es un fosfolípido derivado del glicerol y el mio-inositol, cuando se encuentra unido a residuos de arabinosa (D-arabinosa) y manosa (D-manosa) se llama fosfatidil inositol manósido (PIM) y al adherirse a más residuos de manosa forma el

Sistema Inmune

Sistema inmune innato

El sistema inmune puede dividirse desde el punto de vista funcional en innato y adaptativo. El sistema inmune innato es la primera línea de defensa y está representado por células y factores solubles, entre sus células más importantes están los macrófagos, las células dendríticas, los mastocitos, los polimorfonucleares, entre otras. Las células del sistema inmune adaptativo son activadas principalmente por las células dendríticas, las células del sistema inmune adaptativo son los LT y los LB. Los macrófagos y las células dendríticas están evolutivamente adaptadas para reconocer los patógenos a través de los receptores de reconocimientos de patrones (PRR por su sigla en inglés) como los receptores tipo *toll* (TLR), receptores depuradores, receptores de lectina tipo C (RLC), etc. Estos receptores reconocen estructuras presentes en los patógenos, altamente conservadas y muy importantes para su sobrevivencia, se denominan PAMP por su sigla en inglés, Patrones Moleculares Asociados a los Patógenos.

Algunos PAMP presentes en las micobacterias son: péptidoglicano, lipoarabinomano (LAM) y sus derivados son reconocidos por los PRR tipo lectina C como el receptor de manosa, abundante en la superficie de los macrófagos, o el DC-SIGN en las células dendríticas. Diferentes lípidos y proteínas son reconocidos por TLR2 y TLR4; manosa, dinucleótidos CpG no metilados constituyen PAMPs bien definidos.

Las micobacterias son patógenos intracelulares principalmente de macrófagos, encargados de fagocitar y eliminar material extraño. Pero como la bacteria se adaptó a sobrevivir dentro del macrófago, desarrolló estrategias para penetrar en la célula utilizando diferentes receptores como el receptor de manosa, receptores del complemento (CR1, CR2 y CR4) y receptor Fc. Para eliminar a los patógenos adaptados a la sobrevivencia intracelular, los macrófagos requieren ser activados por los LT CD4 colaboradores. Los macrófagos son células procesadoras y presentadoras de antígeno, procesan antígenos y a través de la molécula del CMH II se lo presentan a los LT CD4 en reposo, si la presentación antigénica fuera exitosa, los LT CD4 proliferan y se diferencian en subpoblaciones denominadas LT CD4 colaboradores o helper (también denominados LTh) .

Los neutrófilos son fagocitos de la inmunidad innata, capaces de reconocer y endocitar micobacterias. Son capaces de eliminar a las bacterias gracias a la acción de las defensinas y proteasas que se encuentran en el fagolisosoma. Algunas cepas de micobacterias inducen menos a la apoptosis de los neutrófilos alargando su sobrevivencia intracelular.

Los macrófagos en la respuesta inmune

Los macrófagos difieren en sus características fenotípicas dependiendo de los estímulos que reciben del medio en donde se encuentran. Se originan de los monocitos provenientes de la médula ósea, normalmente se encuentran en reposo (macrófago cero M0) y cuando se

activan se diferencian en macrófagos M1 y macrófagos M2, este proceso también es conocido como polarización fenotípica de los macrófagos en M1/M2, los cuales en condiciones fisiológicas coexisten en un equilibrio dinámico. Cuando este equilibrio se rompe a favor de algunos de ellos, sobrevienen los procesos patológicos (Figura 5, macrófagos 1-2). Los macrófagos M1 activados poseen clásicamente funciones microbicidas y secretan citoquinas pro-inflamatorias como interleuquina-1 β (IL-1 β), FNT- α y aniones superóxido (O $_2^-$). Las funciones microbicidas de estos macrófagos se generan, por ejemplo por el estímulo de IFN- γ liberado por un linfocitos Th1y las células NK. Este macrófago representa la entidad celular denominada macrófago activado o M1. El M1 incrementa su metabolismo, los fagosomas donde sobreviven estos microorganismos de vida intracelular, se fusiona con los lisosomas formando el fagolisosoma, el pH del fagosoma baja, mediante una bomba de protones ubicada en su membrana, ya que las enzimas lisosomales funcionan a pH ácido, este proceso se conoce como maduración del fagosoma. Los macrófagos M2 son antiinflamatorios y producen mediadores como la interleuquina-10 (IL-10) con efectos inhibitorios en la fusión y maduración del fagolisosoma. También liberan el factor de transformación de los tejidos- β (TGF- β , del inglés: *Transforming Grow Fator- β*) expresa receptores para manosa MR/CD206, (MR del inglés: *Mannose Receptor*), los receptores de basura SR/CD163 (SR del inglés: *Scavenger Receptor*), la función de los macrófagos activados M2 es la de remodelar el tejido y suprimir los efectos de la inflamación.

Los macrófagos ante la hipoxia, responden con factores angiogénicos, cambian de una forma oxidativa a una glucólisis anaeróbica (glicolisis), disminuyen la beta oxidación y acumulan triglicéridos.

Macrófagos espumosos

Los macrófagos se transforman en macrófagos espumosos cuando acumulan en el citosol lípidos neutros (triacilglicéridos), en forma de cuerpos lipídicos, siendo una fuente de energía para las micobacterias que no se dividen (denominadas durmientes). La formación de los macrófagos espumosos se ve influenciada por la hipoxia generada en el centro de las lesiones caseosas, en donde falta irrigación sanguínea y por la presencia de los ácidos micólicos de las micobacterias. Cuando estas bacterias se encuentran en los macrófagos espumosos, se sitúan en la proximidad de los cuerpos lipídicos incorporándolos (Figura 6).

En el metabolismo energético, cuando los macrófagos están inactivados ante una presencia normal de IL-1 y FNT utilizan preferentemente como fuente energética a la glucosa, en cambio en los macrófagos infectados hay una mayor producción de IL-1 y FNT con efectos hipoglucemiantes y en estas condiciones los macrófagos utilizan predominantemente como fuente de energía a los lípidos.

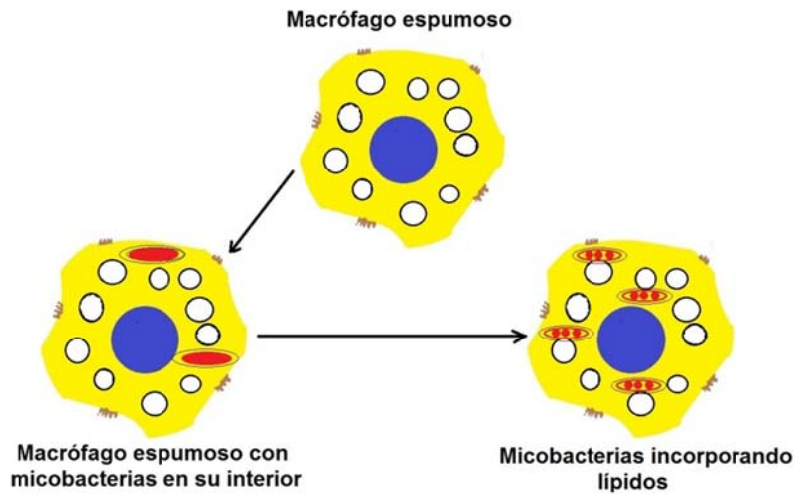


Figura 6. Macrófago espumoso utilizando como fuente energética preferentemente lípidos, ante el efecto hipoglucemiante de una mayor actividad de IL-1 y FNT. Las micobacterias incorporan lípidos de los macrófagos espumosos.

Fagocitosis

El proceso de fagocitosis es esencial y por su intermedio los macrófagos internalizan patógenos, células apoptóticas y material extraño. Con este proceso se desencadenan múltiples vías de señalización, induciendo la formación de los fagosomas.

Las micobacterias patógenas desarrollaron mecanismos que mejoran su habilidad para sobrevivir dentro de los macrófagos, inhibiendo la acidificación y maduración de los fagosomas, los cuales son necesarios para la progresión a un fagolisosoma funcional. Man-LAM de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* interacciona con los PRR de los macrófagos promocionando la producción de IL-10, además inhibe la acidificación y maduración de los fagolisosomas, evita que el pH disminuya de 6,3 e inhibe la localización de los marcadores lisosomales (Figura 7).

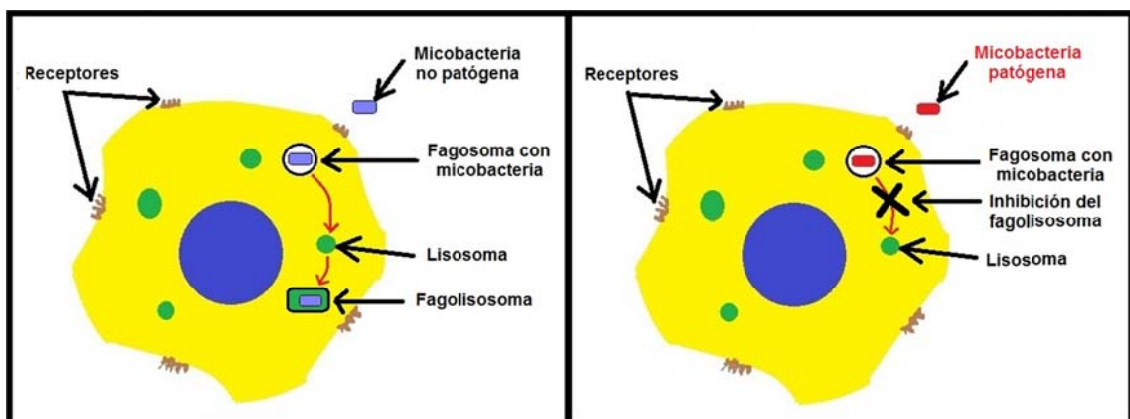


Figura 7. Ejemplo de inhibición de la formación del fagolisosoma en una infección por micobacterias patógenas.

Células dendríticas

Las células dendríticas son el nexo entre el sistema inmune innato y el adaptativo, son células estimuladas por el microambiente del foco infeccioso, tanto por el patógeno, así como las citoquinas que liberan otras células involucradas en la respuesta innata, por ej. neutrófilos, células natural killer (NK) o naturalmente asesinas, macrófagos, mastocitos, células epiteliales, entre otras. Su función es reconocer y endocitar al patógeno en la puerta de entrada del mismo, procesar al antígeno mientras migra hacia el órgano linfático secundario regional atraído por quimioquinas. Una vez en el órgano linfático, se ubica en la zona T donde presenta péptidos antigénicos resultantes del procesamiento a LT vírgenes allí ubicados. La presentación del péptido antigénico en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad, más el co-estimulo de moléculas de superficie así como el estímulo de citoquinas, inducen la activación completa del linfocito T virgen en células efectoras. Más avanzado el proceso queda memoria de este contacto.

Mientras tanto, el tiempo en que tardan en llegar al órgano linfático, la activación de las células de la inmunidad adaptativa y la diferenciación en células efectoras, en el foco infeccioso se sigue dando procesos para eliminar, limitar y contener al agente infeccioso. Cuando se activa la respuesta inmune adaptativa sus células efectoras llegan al foco infeccioso para colaborar con las células del sistema inmune innato y entre los dos grupos celulares poder eliminar al agente (figura 4).

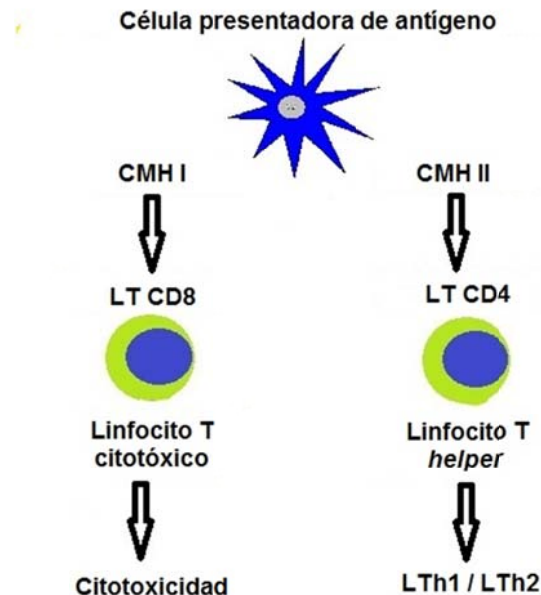


Figura 4. Síntesis de la activación del sistema inmune adaptativo. El resultado del procesamiento antigénico es la presentación de péptidos antigénicos en moléculas del CMH I (complejo mayor de histocompatibilidad tipo I), o moléculas del CMH II (complejo mayor de histocompatibilidad tipo II), reconocidos por linfocito T CD8 citotóxico, linfocito T CD4 colaborador respectivamente, citotoxicidad: dependiente de células citotóxicas, LTh1/LTh2: linfocito T CD4 colaborador tipo 1 (relacionados con la inmunidad celular), linfocito T CD4 colaborador tipo 2 (relacionados con la inmunidad humoral).

Los lípidos de las micobacterias pueden ser presentados por la glicoproteína CD1, un receptor que se expresa en la superficie de macrófagos, LB, células dendríticas y células de Langerhans. La porción hidrofóbica de los lípidos se encuentra dentro de la proteína CD1 y la hidrofílica interacciona con el receptor del linfocito de la inmunidad innata NKT. Cuando los receptores se unen a su ligando se activan vías transduccionales con distintas consecuencias, según se trate de la vía, estos efectos pueden ser activación o desactivación de mecanismos microbicidas, síntesis de citoquinas, etc.

Respuesta inmune adaptativa y su colaboración con las células del sistema inmune innato

En las infecciones producidas por micobacterias los LT CD4 colaboradores se diferencian en varias subpoblaciones, entre ellas dos subpoblaciones con funciones antagónicas los linfocitos Th1 y LTh2, por esta razón se habla de polarización de la respuesta inmune dependiendo del estímulo recibido. El perfil de citoquinas que produce cada subpoblación determina su clasificación y función, de esta forma la población LTh1 presenta un perfil inflamatorio porque produce interferón gamma (IFN- γ) e interleucina 12 (IL-12) y los LTh2 presentan un perfil de citoquinas anti-inflamatorias al producir factor de transformación del crecimiento beta (TGF- β), interleucina 10 (IL-10) e interleucina 4 (IL-4). Los LTh1 colaboran con la respuesta celular tanto innata como adaptativa, y por esto se hace referencia a su función como inmunidad celular, y se diferencia de la inmunidad generada por la población LTh2 y linfocitos T CD4 foliculares que asisten y modulan los diferentes procesos que sufren los LB en el centro germinal, como proliferación de LB y diferenciación en células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas. Por esta función la inmunidad inducida por los LTh2 se la denomina humoral.

La inmunidad celular (LTh1) en las infecciones por micobacterias activan a los macrófagos para que sean capaces de eliminar a las micobacterias en su interior, pero también pueden provocar hipersensibilidad de tipo retardada o hipersensibilidad tipo 4. Esta respuesta a un antígeno se pone de manifiesto mediante la prueba diagnóstica intradérmica de la tuberculina o prueba de PPD (Proteína Pura Derivada). Las citoquinas producidas por los LTh1 activan las funciones fagocíticas y microbicidas de los macrófagos y una vez eliminada la bacteria, el sistema inmune debe reparar el daño celular que suele acompañar el efecto microbicida de los macrófagos M1, mediante los LTh2 quienes tienen funciones anti-inflamatoria y reparadora de los tejidos dañados promoviendo los macrófagos M2 (Figura 5).

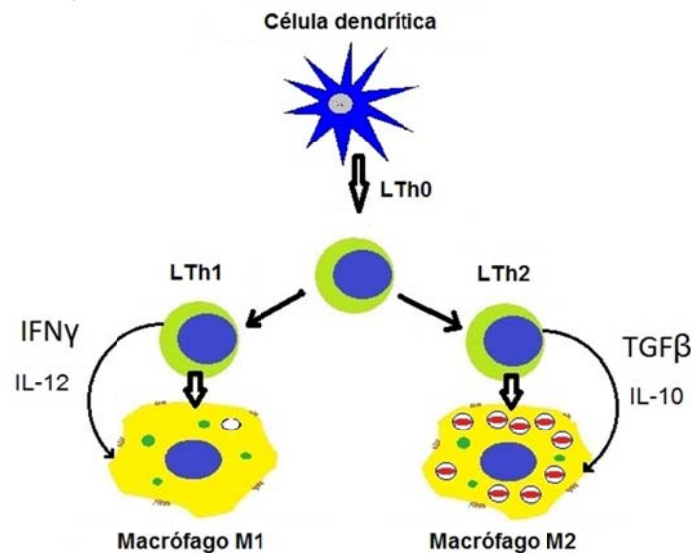


Figura 5. Las citoquinas liberadas por los linfocitos LTh1 promueven la formación de macrófagos M1 (macrófago M1 sin micobacterias en su interior) con funciones microbicidas y probables efectos dañinos en los tejidos circundantes. Los linfocitos LTh2 inducen los macrófagos M2 (macrófagos M2 con micobacterias en su interior) con escaso efecto microbicida y funciones reparadoras de los tejidos.

Apoptosis

El proceso de muerte celular programada llamado apoptosis es uno de los mecanismos que limitan las infecciones intracelulares, sin embargo algunos microorganismos pueden prevenir la apoptosis de las células del hospedador, eludiendo la eferocitosis, un proceso mediante el cual los macrófagos fagocitan cuerpos apoptóticos provenientes de macrófagos que sufrieron apoptosis, asegurando su detección inmune. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* mantiene viva la célula del hospedador previniendo la apoptosis de los macrófagos.

Las micobacterias patógenas inducen la apoptosis en menor medida que las micobacterias no patógenas, esto ocurre mediante la expresión de IL-10 y la disminución de la actividad del FNT- α mediante dos mecanismos; inhibiendo la expresión del FNT- α e induciendo la liberación del receptor para el FNT: TNFR2 (TNFR2, por sus siglas en inglés *Tumor Necrosis Factor Receptor 2*) al cual se une. IL-10 inhibe la apoptosis mediante la expresión de la señal supresora de citoquina 3 (SOCS3 del inglés: *suppressor of cytokine signaling-3*) y modula la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (oxLDL) e inhibiendo las citoquinas involucradas en la progresión de la apoptosis.

Respuesta de las micobacterias a las condiciones del medio

Cuando las micobacterias son sometidas a la privación de sus nutrientes, tienden a adoptar diversas morfologías, denominadas células de reposo (o formas durmientes). En condiciones adversas, responden deteniendo su crecimiento, entran en una fase de reposo y replican sus

cromosomas. Una vez terminada la síntesis de ADN, producen septos en donde se localizan los cromosomas formando compartimentos con cromosomas individuales y material lipídico, su metabolismo cambia, acumulando triacilglicéridos como reserva energética, forzando a la acetil-CoA del ciclo de Krebs a la biosíntesis de lípidos. Subsecuentemente, estas células sufren división celular generando varios mini-bacilos cortos, estas formas viables, pero no cultivables, son inactivas metabólicamente, resistentes a los antibióticos, pierden la condición de ácido alcohol resistencia y presentan una mejor adaptación a las condiciones de privación de nutrientes con un tiempo de sobrevivencia más prolongado. Cuando se retorna a condiciones favorables las bacterias vuelven a su estado original de bacilos largos, antes de comenzar el ciclo regular de división celular (Figura 8).

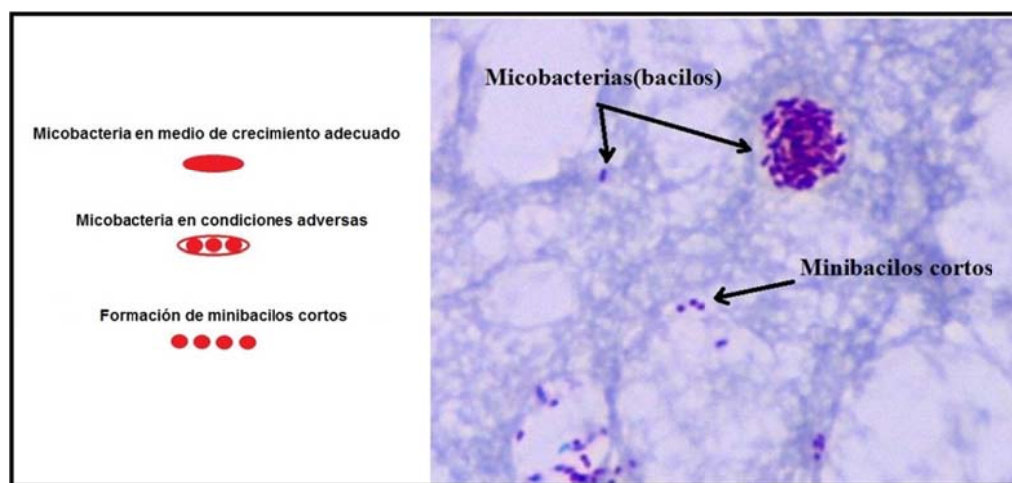


Figura 8. Coloración de Ziehl Neelsen de un cultivo de Map se observan las típicas formas bacilares y algunos minibacilos.

Formación de granulomas

La infección por micobacterias generalmente produce la formación de los granulomas (difusos en paratuberculosis y delimitados en tuberculosis) la mayoría de los mismos, podría originarse por una bacteria y el destino de algunos granulomas en un mismo individuo es la esterilización, en cambio otros pueden progresar o mantenerse durante años dando lugar a la infección latente. Para que se produzca este tipo de infección los macrófagos deberían sobrepasar su tiempo de vida medio, estimado en aproximadamente 24 días; otra condición puede ser la permanente afluencia de monocitos y macrófagos inmaduros al granuloma, garantizando la renovación celular del hospedaje para las micobacterias. Estas bacterias se replican en los macrófagos hasta alcanzar un número determinado en donde la célula hospedadora se lisa unas 20-40 UFC (Unidad Formadora de Colonia) liberando las micobacterias, las cuales se diseminan.

Diagnóstico

Prueba de la tuberculina

La prueba de la tuberculina es una técnica diagnóstica terciaria, que determina la presencia de linfocitos de memoria que permanecen luego que el individuo haya tenido contacto con el patógeno.

La PPD o derivado proteico purificado se obtiene del cultivo de *Micobacterium bovis*. Se inactivan por autoclave, y después de distintas etapas que involucran filtración, clarificación, precipitación y lavados se obtiene una mezcla de antígenos compuesta principalmente por proteínas somáticas y secretadas (93 %) hidratos de carbono (6 %) y ácidos nucleicos (1 %). La reacción a la tuberculina se genera al inocular en forma intradérmica la tuberculina o proteína pura derivada. Las células presentadoras de antígeno presentes en la zona de la inoculación captan y procesan al antígeno, migran al órgano linfático regional en donde es presentado a los LT. Si el individuo tuvo previamente contacto con la micobacteria se encontrará sensibilizado, presenta células de memoria que una vez activadas migran al sitio de inoculación, dando como resultado a las 72 horas, un incremento del grosor de la piel en el punto de inoculación. Esta reacción también se conoce como hipersensibilidad de tipo retardado o tipo IV (Figura 9).

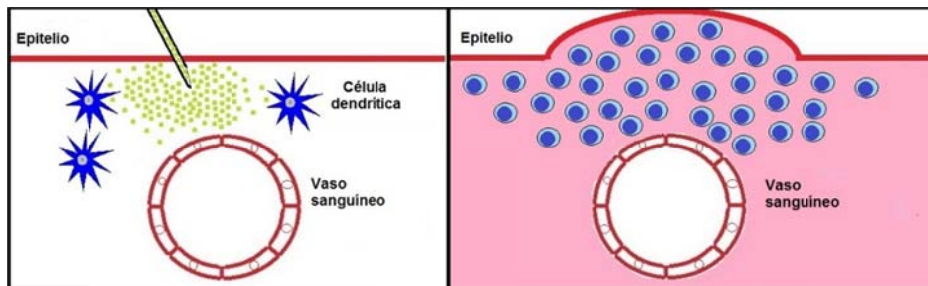


Figura 9. Reacción de la tuberculina: después de inocular la tuberculina las células presentadoras de antígeno migran al linfonodo regional y si el animal estaba sensibilizado se produce una reacción en el punto de inoculación.

Referencias

- Andrade MR, Amaral EP, Ribeiro SC, Almeida FM, Peres TV, Lanes V, D'Império-Lima MR, Lasunskaja EB. Pathogenic *Mycobacterium bovis* strains differ in their ability to modulate the proinflammatory activation phenotype of macrophages. BMC Microbiol. 2012; 12(166):1-12.
- Appelberg R, Moreira D, Barreira-Silva P, Borges M, Silva L, Dinis-Oliveira RJ, Resende M, Correia-Neves M, Jordan MB, Ferreira NC, Abrunhosa AJ, Silvestre R, The Warburg effect in mycobacterial granulomas is dependent on the recruitment and activation of macrophages by interferon- γ . Immunol. 2015; 145(4):498-507.
- Huang Z, Luo Q, Guo Y, Chen J, Xiong G, Peng Y, Ye J, Li J. *Mycobacterium tuberculosis*-Induced Polarization of Human Macrophage Orchestrates the Formation and Development of Tuberculous Granulomas In Vitro. PLoS One. 2015; 10(6):1-16.
- Hussain T, Shah SZ, Zhao D, Sreevatsan S, Zhou X. The role of IL-10 in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. Cell Commun Signal. 2016; 14(1):14-29.
- Patil PS, Zulueta MM and Hung SC. Synthesis of Phosphatidylinositol Mannosides. J Chinese Chemical Society. 2014; 61(1):151–162.
- Peddireddy V, Doddam SN, Ahmed N. Mycobacterial Dormancy Systems and Host Responses in Tuberculosis. Front Immunol. 2017; 8(84):1-19.
- Rajni, Rao N, Meena LS. Biosynthesis and Virulent Behavior of Lipids Produced by *Mycobacterium tuberculosis*: LAM and Cord Factor: An Overview. Biotechnol Res Int. 2011; 1-7.
- Schorey JS, Schlesinger LS. Innate Immune Responses to Tuberculosis. Microbiol Spectr. 2016; 4(6):1-27.
- Jankute M, Cox JA, Harrison J, Besra GS. Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. Annu Rev Microbiol. 2015; 69:405-423.
- Thirunavukkarasu S, de Silva K, Plain KM, J Whittington R. Role of host and pathogen-associated lipids in directing the immune response in mycobacterial infections, with emphasis on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Crit Rev Microbiol. 2016; 42(2):262-75.

CAPÍTULO 13

Salmonela

Beatriz Del Curto y Fabiana A. Moredo

Salmonella es un patógeno entérico intracelular facultativo. El género está integrado por más de 2500 serovares de los cuales Typhi, Typhimurium y Enteritidis son ejemplo de los más estudiados debido a su impacto en la salud humana y animal. Son microorganismos gramnegativos perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Se los encuentra en tracto gastrointestinal de hombre y animales y se asocian con problemas gastrointestinales como enteritis aguda, subaguda o crónica; también pueden producir cuadros más graves de septicemia y abortos debido a su capacidad de invadir células y a su particularidad de sobrevivir dentro de células fagocítica. Se disemina por el organismo hospedador a través de los macrófagos, por vía linfática y sanguínea. La dosis infectiva, puede ser menor a 10^1 UFC y para que la enfermedad se desarrolle, es importante la condición fisiológica del hospedador.

Todas las salmonelas son potencialmente patógenas. Para producir enfermedad debe atravesar las barreras del hospedador y llegar a sitios específicos. Resisten el pH ácido estomacal y colonizan el intestino, invaden las células epiteliales y migran hacia la lámina propia de la región ileocecal, se multiplican en los folículos de la región linfoide desencadenando hiperplasia e hipertrofia retículoendotelial. La infección, muchas veces, se limita al intestinal ocasionando enteritis.

Una clasificación de *Salmonella* se basa en la variedad de hospedadores. Una escuela de pensamiento, basándose en la asociación que tiene la bacteria con la especie hospedadora, la divide en tres grupos. Los serovares hospedador específico, que suelen causar enfermedad sistémica en un número limitado de especies filogenéticamente no relacionadas, de este modo, *S. Typhi*, *S. Gallinarum* y *S. Abortusovis* están asociados casi exclusivamente con enfermedad sistémica en seres humanos, aves y ovejas, respectivamente.

Los serovares ubicuos, como *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* generalmente inducen gastroenteritis en una amplia gama de especies de hospedadores no relacionados.

Otra escuela divide a los serovares en dos grupos principales los cuales producen diferentes patologías (patovares): por un lado las que se caracterizan por producir enfermedades sistémicas y por otro las que colonizan el intestino y producen enteritis. En este modelo, que tiene la capacidad de producir infecciones típicas tifoidea se limita a los serotipos que producen la enfermedad, ya sea en mamíferos (*S. Dublin*, *Typhimurium*, *S. Enteritidis* en

ratones, *S. Choleraesuis* en una amplia gama de especies de mamíferos y Typhi y *S. Paratyphi*, restringido al hombre) o en especies de aves (*S. Gallinarum* y su serovar relacionada, *S. Pullorum*).

Salmonella Choleraesuis es muy virulento y produce fiebre tifoidea de forma experimental en ratones, ratas, cobayos, conejos y también en terneros. Por el contrario, *S. Typhi* y *S. Paratyphi* producen infección típica solo en el hombre. Todos estos serovares nunca producen infección típica en aves adultas. También es cierto, que *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* nunca producen fiebre tifoidea típica en mamíferos.

Salmonella Typhimurium produce enteritis en una variedad de mamíferos adultos incluyendo al hombre. La situación con otros serovares es menos clara, aunque algunos de ellos producen enteritis en animales jóvenes de varias especies incluyendo bovinos, porcinos, ovinos, animales de compañía y aves de corral. Por lo general, los animales muy jóvenes son muy susceptibles a las infecciones por *Salmonella* debido principalmente a dos cuestiones, que la microbiota intestinal todavía no es inhibitoria y la inmadurez inmunológica. Los diferentes serovares pueden asociarse con la producción de más de tres tipos distintos de infección:

El primer grupo está asociado con infecciones: *S. Typhi* y *S. Paratyphi A* y otras muy raras relacionadas con *S. Paratyphi B*, productoras de tifus en el hombre. *S. Gallinarum* en producción aviar y *S. Choleraesuis* en cerdos.

El segundo grupo está asociados con infecciones sistémicas con afección frecuente de aparato reproductor, pudiendo también extenderse al intestino en animales jóvenes. Éste incluye *S. Dublin* en bovinos, *S. Abortusovis* en ovejas; *S. Abortusequi* en equinos y *S. Pullorum* en aves.

Finalmente se sabe que un pequeño grupo de serovares son capaces de producir trastornos severos en el sistema inmune.

La mayoría de estos serovares no producen enfermedad en adultos, sin embargo pueden colonizar el aparato digestivo causando enteritis infecciosa subclínica.

Factores de virulencia

Salmonella Typhi y *S. Typhimurium* comparten aproximadamente el 90 % de sus genes. El 10 % restante corresponden a genes que codifican factores de virulencia, los cuales determinan el poder patógeno de estas bacterias. La mayoría de estos genes se encuentran en "Islas de Patogenicidad de *Salmonella*" (SPI). El estudio de SPI y otros genes de virulencia asociados con la invasión y la supervivencia dentro de fagocitosis y células no fagocíticas, permitió entender mejor el proceso de infección de estas bacterias.

Islas de patogenicidad

El término SPI fue utilizado inicialmente para describir dos zonas grandes e inestables de DNA cromosomal en *E. coli* enteropatógeno, que codifica un número de proteínas reguladoras

importantes para la virulencia. Desde su concepción, el término evolucionó incluyendo regiones de expresión de DNA cromosomal, esenciales para la patogenicidad que no parece ser propio.

Las islas de patogenicidad están formadas por un grupo de genes que codifican factores específicos de virulencia, presentan repeticiones directas en sus extremos, portan genes que codifican factores de movilidad como integrasas, transposasas o secuencias de inserción y se encuentran frecuentemente insertadas en un loci de ARNt.

Salmonella presenta múltiples genes involucrados con la invasión, que forman la SPI-1; se trata de un segmento de 35-40 kb que contiene 31 genes que pueden ser divididos en categorías que incluyen: genes que codifican el sistema de secreción tipo III (SSTT), denominados *inv-spa*, genes que codifican proteínas involucradas con la translocación de las moléculas efectoras dentro del citoplasma de la célula hospedadora y genes que codifican las proteínas efectoras y sus chaperonas.

SPI-1: se encuentra presente en *S. bongori* y todas los serovares de *S. enterica*. Probablemente, fue adquirida en la evolución temprana de *S. enterica* por transferencia de genes de manera horizontal. Codifica determinantes que median la invasión de células hospedadoras no fagocíticas, apoptosis de macrófagos *in vitro* y activación de vías MAP quinasas⁹ y factores de transcripción. Se sugieren que SPI-1 funciona en los primeros estadios de la infección. Actualmente se sabe que *Salmonella* cuenta con cinco islas de patogenicidad: SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4 y SPI-5.

SPI-2: también codifica para un SSTT que se activa cuando la bacteria se encuentra intracelularmente dentro de una vacuola. Consta de 32 genes que regulan la supervivencia y replicación bacteriana en los compartimentos intracelulares de fagocitos y células epiteliales.

SPI-3: también es requerida para la supervivencia intracelular en macrófagos, provee productos esenciales para el crecimiento en condiciones limitadas de Mg²⁺.

SPI-4: codifica un supuesto sistema de secreción tipo I (SSTI) que media la secreción de toxinas y se cree que participa en la adaptación de *Salmonella* al ambiente intracelular en los macrófagos.

SPI-5: codifica proteínas efectoras como SopB (SigD) involucradas con la secreción de fluidos y con la respuesta inflamatoria en la mucosa intestinal, además de estimular la secreción de cloro; se encuentra asociada con el flujo de macrófagos, para su secreción utiliza el SSTT de la SPI-1. SopB/SigD tienen actividad de inositol fosfato fosfatasa, generando una gran cantidad de fosfolípidos de inositol e inositol fosfato con capacidad de señalización, que además de participar en la reorganización del citoesqueleto, se encuentran involucradas en la secreción de fluidos al estimular la eliminación de cloro. Otras proteínas codificadas en esta isla son: MarT con secuencia similar a ToxR, las mutantes se ven afectadas en su capacidad para producir salmonelosis entérica pero no salmonelosis sistémica y PipA (*pathogenicity island encoded protein*) que es secretada y translocada vía el SSTT de SPI-2, que contribuye con la secreción de fluidos y reacción inflamatoria en la mucosa intestinal.

⁹ MAP quinasa: familia de proteínas quinasas que se activan cuando las células reciben señales de crecimiento y división.

SPI 1 y SPI 2, parecen tener roles diferentes en la patogénesis, SPI 1 es requerida para la penetración inicial a la mucosa intestinal y SPI 2 necesaria para los estadios subsecuentes de la infección sistémica.

Sistemas de secreción

Una característica esencial de la patogenicidad de *Salmonella* es su habilidad de engañar a la célula hospedadora en una interacción llamada de doble vía o cruzada, lo que lleva a la respuesta tanto de la bacteria como de la célula hospedadora.

Salmonella activa un sistema especializado de secreción tipo III, SSTT, de contacto que permite a ciertos bacilos gramnegativos secretar e inyectar proteínas de patogenicidad en el citosol de la célula hospedadora eucariota. SSTT también se encontró en *Yersinia*, *E. coli* enteropatógeno y *Shigella*, entre otros. En general, las proteínas inyectadas tienen la función de los mensajeros de transducción de las células eucariotas, siendo capaces de interferir en las vías de señalización de la célula hospedadora. En el caso de *Salmonella*, esto lleva a la reorganización del citoesqueleto celular, estableciendo nichos subcelulares, facilitando la estrategia patogénica altamente adaptada a líneas de comunicación con la defensa del hospedador. La interacción de patógenos bacterianos dentro de las células hospedadoras, está caracterizada por factores localizados en la superficie bacteriana o bien son secretados en el espacio extracelular. El término "secreción" es utilizado para describir el transporte activo de proteínas del citoplasma a través de las membranas interna y externa bacterianas o en la superficie de la célula bacteriana. La exportación se refiere al transporte de proteínas del citoplasma en el espacio periplásmico. Se describieron siete tipos de sistema de secreción, diferenciados de forma tal que las proteínas son transportadas a través de la membrana externa o al espacio periplásmico. Todos los sistemas de secreción utilizan la energía obtenida por hidrólisis del ATP para transportar las proteínas. Los sistemas de secreción tipo I y tipo III transportan las proteínas directamente del citoplasma de la bacteria hasta el citoplasma de la célula eucariota, sin pasar por el periplasma. El sistema de secreción tipo II funciona de manera diferente, la proteína que se encuentra en el citoplasma de la bacteria no pasa directamente a la célula eucariótica, tiene un paso intermedio en el periplasma de la bacteria donde sufre un proceso de descarboxilación en el extremo N-terminal, haciendo que la proteína que ingresa a la célula eucariota sea diferente de la que se encuentra en el citoplasma bacteriano.

Salmonella es la única bacteria descrita que contiene dos SSTT cuya finalidad es la translocación de proteínas asociadas con la patogenicidad bacteriana, directamente al citosol de las células hospedadoras.

En *S. Typhimurium*, *S. Typhi* y *S. Gallinarum* se demostró la presencia de una enterotoxina similar a la enterotoxina de *Vibrio cholerae* (CT) y toxina termolábil (LT) de *E. coli* enterotoxigénico.

Mecanismo de patogenicidad

Los pasos de la patogenicidad de *Salmonella* son: adhesión, invasión, replicación, evasión de los mecanismos de defensa y daño en el hospedador. Durante los mismos, la bacteria experimenta severos cambios que modulan la expresión de sus genes (pH gástrico, aumento de temperatura, baja tensión de oxígeno y alta osmolaridad).

Adherencia

La supervivencia de un microorganismo en un lugar determinado depende de su habilidad para adherirse. Las adhesinas tienen una estructura que les permite reconocer receptores específicos y pueden dividirse en fimbriales y no fimbriales. En general, las adhesinas de bacterias gramnegativas son: fimbrias, fibrillas, flagelos, LPS y cápsula. Ejemplo, fimbria tipo 1, fimbria codificada por plásmidos, fimbria polar larga y fimbria agregativa delgada (Curli). Se debe tener en cuenta que posiblemente, las fimbrias ayuden a la bacteria a establecer un fuerte contacto con las células hospedadoras y además permitan la interacción de factores que estimulan la migración de neutrófilos a través de los epitelios. Esta unión determina el tropismo bacteriano. En consecuencia, las adhesinas activan LB y neutrófilos dando como resultado la proliferación celular y secreción de citoquinas.

El patrón de colonización intestinal de los serovares de *S. enterica*, depende de cada uno de ellos, de la naturaleza de la infección y de una cantidad de factores propios del hospedador. Así, para los serovares productores de fiebre tifoidea, la colonización es la etapa inicial del proceso de la enfermedad y no solo son importante la adhesión, invasión y supervivencia intracelular, sino también presumiblemente, la supervivencia en el intestino durante el tiempo suficiente para que estos eventos adicionales puedan tener lugar y ser eliminados en las etapas posteriores de la enfermedad.

La virulencia y capacidad de colonización, están íntimamente relacionadas con el serovar.

Luego de haber ingresado en el hospedador, *Salmonella* puede adherirse directamente tanto a la superficie de las células como a la matriz extracelular; cuando el tejido está dañado, la matriz extracelular subyacente está expuesta, la fimbria SEF17 se encarga de mediar la adherencia a una gran variedad de matrices extracelulares y proteínas séricas, incluyendo fibronectina, laminina y plasminógeno.

En cada uno de los serovares de *S. enterica*, se describieron diferentes operones¹⁰ que participan en la adhesión a diferentes tipos celulares. Los genes de cada operón se expresan cuando en el hospedador, las condiciones de temperatura, pH, osmolaridad y disponibilidad de nutrientes son las adecuadas.

¹⁰Un operón se define como una unidad genética funcional formada por un grupo o complejo de genes capaces de ejercer una regulación de su propia expresión por medio de los sustratos con los que interactúan las proteínas codificadas por sus genes. Este complejo está formado por genes estructurales que codifican para la síntesis de proteínas (generalmente enzimas), que participan en vías metabólicas cuya expresión generalmente está regulada por otros 3 factores de control, llamados: promotor, operador y gen regulador.

Cápsula y flagelos

Salmonella puede presentar cápsula y flagelos según el serovar. Sólo *S. enterica* serovar Typhi, *S. Paratyphi C* y *S. Dublin*, presentan cápsula. Por otra parte, todas las salmonelas se consideran móviles con excepción de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* que si bien se pensaba que carecía de flagelos, se demostró por microscopía electrónica que presentan uno solo, pequeño y deformado.

Invasión

Salmonella invade células del tejido linfoide, incluyendo las placas de Peyer y tonsilas cecales en las aves. Se adhiere apicalmente a las células epiteliales del íleon y a las células M que debido a la ausencia del borde en cepillo y glicocálix, representan una puerta de entrada ideal para las enterobacterias. La interacción entre *Salmonella* y las células hospedadoras es compleja. Este microorganismo utiliza las señales de transducción del hospedador, afectando al citoesqueleto y proteínas superiores produciendo fallas en la membrana lo que posibilita la invasión bacteriana.

Salmonella posee un mecanismo particular de patogenicidad ya que se dirige a células hospedadoras que no son normalmente fagocíticas como las células epiteliales de la capa mucosa. Presumiblemente, esta estrategia de invasión asegura un nicho celular protegido para que el microorganismo se replique o persista. Lo hace a través de un mecanismo conocido como disparo. La bacteria envía señales a las células epiteliales que inducen re-organización del citoesqueleto dando lugar a la formación de ondulamiento (*ruffling*) en su superficie como respuesta al contacto. Se reconocen varias proteínas efectoras de la SPI-1 vinculadas con este proceso: SipA, SopE, SopE2 y SopB.

SipA es una proteína de unión a actina que inhibe la despolimerización de F-actina y activa T-plasmina.

SopE se comporta como un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF)¹¹ (*guanine exchange factor*), en las proteínas RhoGTPasas¹² (CDC42¹³ y Rac) induciendo *ruffling* de la membrana, que permite la internalización de *Salmonella*, también estimula las MAP quinasas (Mitogen-activated protein), Erk (quinasa reguladora por señales extracelulares) y la JNK (quinasa terminal).

SopE2, activa a CDC42, la cual actúa con la familia de proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) para activar al complejo Arp2/3 el cual inicia la polimerización de actina y ramifica filamentos de actina.

SopB (*Salmonella outer protein*), como se conoce para *S. Dublin*, o SigD (*Salmonella invasion genes*) para *S. Typhimurium*, también reorganiza el citoesqueleto de actina por su actividad de inositol fosfato fosfatasa.

¹¹GEF: factor cuya presencia es fundamental en el transporte de proteínas a través del complejo de poro nuclear.

¹²RhoGTPasas: proteínas reguladoras del citoesqueleto.

¹³CDC42, Rho, Rac: miembros de la familia de proteínas G monoméricas que estimulan la formación de estructuras celulares que poseen actina.

La proteína SptP (*Salmonella protein tyrosin phosphatase*) es una tirosina fosfatasa, que independientemente de esta actividad, se comporta como GAP (*GTPasa activating protein*), es decir, cambia Rac·GTP a Rac·GDP, con lo que evita el *ruffling* estimulado por SopE además antagoniza la activación de la vía de señalización JNK.

Salmonella estimula a la fosfolipasa C, que cataliza la escisión del fosfatidilinositol 4-5bifosfato (PIP₂) de membrana, generando inositol 1,4-5 trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). IP₃ induce la liberación del Ca²⁺ almacenado en el retículo endoplásmico (RE). El calcio y el fosfoinositol afectan proteínas de unión a actina, muchas de las cuales (alfa-actinina, talina, tubulina, tropomiosina y ezrina) son recluidas en el sitio de entrada de la bacteria. El DAG junto con el Ca²⁺ activan a la proteína quinasa C (PKC), que sirven para activar a otras enzimas y finalmente a factores de transcripción. El evento involucra CDC42 y Rac1 pero no Rho. Las citocalasinas B y D, que evitan la polimerización de los microfilamentos de actina previenen la entrada de *Salmonella*, mientras que los inhibidores de las tirosinquinazas no bloquean su entrada. En otro tipo de células, la fosfolipasa C no juega un papel importante en la invasión de *Salmonella* sino que la infección desencadena MAP quinazas, que a su vez activan a la fosfolipasa A2 (PLA2) dando como resultado la producción de ácido araquidónico (AA), que es convertido en leucotrienos D4 (LTD4) por varias enzimas, incluyendo 5-lipooxigenasas (5-LO). LTD4, directa o indirectamente activa los canales de calcio, causando la entrada del catión que trae como consecuencia la reorganización del citoesqueleto. El aumento de calcio estimula la secreción de cloro y por lo tanto se produce diarrea, ya que el agua lo acompaña. La internalización es rápida, *Salmonella* se observa dentro de los endosomas en las células fagocíticas y no fagocíticas, posteriormente la superficie celular vuelve a la normalidad gracias al efecto de SptP.

Salmonella activa el flujo de Ca²⁺. Las proteínas efectoras SipB, SipC y SipD son las responsables de formar poros en la membrana de las células hospedadoras. Las proteínas efectoras pueden ser consideradas como toxinas debido a que de alguna manera afectan a la célula eucariótica, sin embargo a diferencia de éstas, carecen de receptores de unión por lo que son incapaces de tener acceso directo a su sitio de acción si no es por la contribución del SSTT. *Salmonella* produce efectos citotóxicos que resultan en la destrucción de las células M y la invasión de enterocitos adyacentes tanto por la cara apical como por la basolateral, induce apoptosis de macrófagos activados mediante la proteína efectora SipB (*Salmonella invasion protein*) y fagocitosis inducida en macrófagos no activados, para poder ser transportada a hígado y bazo. SipB se asocia con la proteasa pro-apoptótica caspasa I que activa a las citoquinas pro-inflamatorias IL-1β e IL-18. El fenotipo citotóxico es dependiente de la fase de crecimiento bacteriano.

S. Typhimurium puede llegar a hígado y bazo por una ruta alternativa, que no requiere colonización intestinal o invasión de células epiteliales intestinales, la bacteria es llevada directamente del lumen intestinal a circulación, bazo e hígado por fagocitos que expresan CD18.

Evación de los mecanismos de defensa del hospedador

Después de un periodo de adaptación de 3-4 horas, *Salmonella* se replica dentro de los endosomas a pesar de las concentraciones limitadas de Mg^{2+} y Fe^{2+} y pH ácido que presentan; la acidificación dentro del fagosoma es necesaria para la supervivencia y replicación intracelular. Los endosomas son espaciosos, lo cual permite que los productos antibacterianos se diluyan, se expresen genes que aumentan la supervivencia intracelular y sus productos neutralicen péptidos catiónicos. Una proporción significativa de macrófagos sufre apoptosis después de la invasión, situación contraria se observa en células epiteliales. Con la finalidad de establecer un microambiente fagosomal que permita sobrevivir a los endosomas, presentan la capacidad de fusionarse selectivamente con otras vesículas que portan diferentes marcadores. Estos marcadores lisosomales se localizan en extensiones filamentosas, microtúbulo-dependiente, que se conectan con los endosomas; una función potencial de estas estructuras es proveer de nutrientes a las bacterias intracelulares.

SopB es esencial en el establecimiento y replicación intracelular de *Salmonella* al estar involucrada en la formación de los endosomas; mantiene altos niveles de fosfatidilinositol trifosfato en la membrana de las mismas, lo que evade la unión con los lisosomas y permite la unión con otros endosomas.

Salmonella expresa enzimas que inactivan directamente radicales reactivos de oxígeno y nitrógeno que antagoniza al óxido nítrico¹⁴ y superóxido dismutasa. Su producción está inducida por un factor también necesario para la transcripción de genes involucrados en la adaptación a ambientes estresantes, como choque ácido, limitación de nutrientes, estrés oxidativo. *Salmonella* también produce superóxido dismutasas. Otras proteínas que son necesarias para sobrevivir bajo estrés oxidativo son la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, agente quelante del Fe^{2+} , que evita su participación en la formación de los radicales reactivos del oxígeno. Finalmente, proteínas efectoras codificadas en SPI-2 se consideran involucradas en la protección contra el estallido respiratorio al prevenir la unión de las vesículas que contienen NADPH-oxidasa con los endosomas.

Daño en el hospedador

En la respuesta innata, el sistema inmune detecta la presencia de *S. Typhimurium* presente en los tejidos mediante receptores de reconocimiento de patrones (por su sigla en inglés PRR). *Salmonella* presenta estructuras conservadas y accesorias denominadas PAMPs¹⁵ por ejemplo cadena lateral O (Ag O), fosfolípido A del LPS, flagelos y fimbrias. El Ag O es reconocido por la fracción C3 del sistema del complemento activando la vía alternativa del mismo. Los fragmentos C3a y C5a generados durante el proceso son unos de los primeros y más potentes inductores de la inflamación. El fosfolípido A es reconocido por PRR de señal como TLR¹⁶4, la flagelina por TLR5 y la fimbria Curli por TLR1/TLR2.

¹⁴El óxido nítrico (NO), es molécula gaseosa que transmite señales a las células vecinas, estimulando a la guanilil ciclasa.

¹⁵PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos.

¹⁶TLR: *Toll-like receptors*.

TLR4, TLR1/TLR2 y TLR5 se acoplan a una proteína común, que activa la señal de transducción vía MAP quinasas que induce la expresión de genes pro-inflamatorios por activación de dos factores nucleares de transcripción: proteína activadora 1 (AP1)¹⁷ y el factor kappa- cadena liviana- potenciador de células B activadas (FN-kB).

La respuesta inmune innata es el resultado de la sumatoria de procesos de reconocimiento de los PRR superficiales, endocíticos y citoplásmicos. En el caso de *S. Typhimurium* inyecta en la célula huésped PAMPs directamente en su citoplasma a través del SSTT-1, donde también ingresa el complejo aguja del SSTT (PrgJ) y por consiguiente la flagelina adyacente. La presencia de ambos es reconocida por un receptor asociado a caspasas¹⁸ llamado NLRC4, ocasionando la activación de caspasa 1. Luego de ser activada, caspasa 1 actúa sobre los precursores de interleuquina 1 β (IL) e IL-18 para formar los péptidos maduros. La proteína SopE dentro del citoplasma de la célula hospedadora, también activa la caspasa 1 pero aún no se conoce el mecanismo a través del cual ocurre. Finalmente, se conocen otros dos PRRs citoplasmáticos que se activan con el ingreso de *S. Typhimurium* (NOD1 y NOD2) e interactúan con una MAP quinasa que media la activación de NF- κ B.

Tanto los patrones de reconocimiento como la detección de los procesos inducidos por los patógenos por células epiteliales, mononucleares (macrófagos y células dendríticas) y complemento, resulta en la producción de IL-1 β , IL-12, IL-18, IL-23, TNF- α , IFN- γ y C5a, un cóctel cuya función es la señal de partida de la respuesta de los tejidos frente a las bacterias. Los acontecimientos iniciados con su liberación culmina en tres posibles vías de defensa del hospedador: una dirigida contra la forma intracelular de la bacteria, activación de macrófagos; otra contra las bacterias ubicadas extra-celularmente, reclutamiento de neutrófilos y finalmente, liberación epitelial de péptidos antimicrobianos dentro del lumen intestinal contra las bacterias que allí se encuentran.

IL-12 e IL-18 inducen la producción de IFN- γ , citoquina que mejora, en gran medida, la habilidad de los macrófagos en eliminar la *S. Typhimurium* intracelular. IL-23 e IL-1 β potencian la inducción de la producción de IL-17A por los LT CD4 17, células NK. IL-17A actúa conjuntamente con IL-1 β y TNF- α induciendo la liberación de quimiocinas de células epiteliales (CXC). CXC y C5a son potentes quimio-atrayentes de neutrófilos, células particularmente efectivas en destruir *S. Typhimurium* extracelular. Finalmente, IL-23 contribuye con la producción de IL-22, una citoquina que estimula a las células epiteliales a liberar péptidos antimicrobianos en el lumen intestinal (lipocalin 2).

Como consecuencia de la colonización intestinal y los altos niveles de excreción fecal, particularmente en animales destinados al consumo humano, las bacterias pueden entrar en la cadena alimentaria, infectar el intestino y causar gastroenteritis.

¹⁷AP-1: factor de transcripción que estimula en el núcleo, la expresión de genes necesarios para el crecimiento celular.

¹⁸Caspasa: cada uno de los elementos de una familia de proteasas que degradan a otras proteínas celulares, como parte del proceso de apoptosis.

Enfermedad en animales

Salmonella en bovinos

La salmonelosis del ganado bovino es de distribución mundial y se asocia principalmente con los serovares *S. Typhimurium* y *S. Dublin*. Los bovinos infectados pueden excretar hasta 10^8 UFC/g de *Salmonella* y la contaminación del medio ambiente es de este modo una potente fuente de infección para animales y humanos. Los animales infectados pueden excretar *Salmonella* durante años o incluso de por vida. En los portadores latentes, estas bacterias persisten de forma subclínica en los tejidos, pero se excreta por materia fecal sólo de forma intermitente. La excreción puede ser activada por el estrés, por ejemplo, en el parto o después de la infección por *Fasciola hepatica* o Babesia.

Salmonella en terneros

En terneros, la enfermedad clínica normalmente ocurre entre las semanas 2 y 6 de edad. Los signos clínicos varían, pero se observa con mayor frecuencia, la forma entérica de la salmonelosis también puede presentarse como neumonía y finalmente hacerse sistémica. Los terneros rápidamente se debilitan y deshidratan y si no es tratada, los animales infectados mueren generalmente 5 a 7 días después de la aparición de la enfermedad. Los terneros que se recuperan de la infección no suelen ser portadores.

Salmonella en ovinos

En comparación con la salmonelosis bovina, la incidencia general de la enfermedad en el ganado ovino es baja. En muchos países, la enfermedad causada por el serovar *S. Abortusovis*, especie-específico, sigue siendo un importante problema económico. En otros, es un problema relativamente menor y son predominantes otros serovares como *S. Typhimurium*. Hay mucha menos información sobre las vías de transmisión. *S. Abortusovis* es invasiva para células epiteliales ovinas, tanto *in vitro* como *in vivo*; esta propiedad depende de su sistema de secreción de tipo tres (SSTT).

Salmonella en cerdos

Los serovares de *Salmonella* asociados con enfermedad clínica en los cerdos se pueden dividir en dos grupos: especie-específicos como *S. Choleraesuis* y serovares ubicuos como *S. Typhimurium*. La neumonía es una característica común de las infecciones por *S. Choleraesuis*, siendo tonsilas y pulmones los sitios más importantes de invasión.

La salmonelosis clínica en cerdos generalmente toma dos formas: la septicémica causada por el serovar *S. Choleraesuis* y la enterocolitis causada por serovares como *S. Typhimurium*.

Existe cierta evidencia de que los serovares *S. Typhimurium* y *S. Choleraesuis* puede invadir la mucosa intestinal por distintas vías. Después de la infección oral, *S. Typhimurium* muestra una baja capacidad de invasión de la mucosa entérica y no revela ningún tropismo por una localización intestinal específica. Sin embargo, *S. Choleraesuis* se encuentra predominantemente en colon y en la superficie luminal de las células M de las placas de Peyer del íleon.

Salmonella en aves

La pullorosis y la tifosis aviar son enfermedades sistémicas que se producen principalmente en pollos y pavos, pero también son importantes en aves de caza. La tifosis aviar es causada por *S. Gallinarum* y la pullorosis por la serológicamente idéntica *S. Pullorum*. La transmisión horizontal de *S. Gallinarum* es en gran parte fecal-oral, el microorganismo coloniza el intestino pero pronto desaparece de las heces para resguardarse en ganglio cecal y placas de Peyer.

Están prácticamente erradicadas en países desarrollados sin embargo, prevalecen en regiones donde la producción se realiza en instalaciones deficientes en medidas de bioseguridad.

A pesar que los pollos son los hospedadores más importantes brotes naturales causados por estos serovares también se describieron en pavos, gallinas de guinea y otras especies de aves. Las fuentes de infección de las aves de corral son muchas, incluyendo a ellas mismas, la alimentación y el medio ambiente y en los casos de *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* y *S. Enteritidis* la transmisión vertical.

Profilaxis

Si bien experimentalmente se evaluaron distintas vacunas vivas e inactivadas para el control de la tifosis aviar, en Argentina y en varios países de Latinoamérica solo tiene uso generalizado la vacuna viva basada en la cepa 9R30, que es la única aprobada por las autoridades sanitarias para la prevención de la enfermedad en gallinas ponedoras. Con esta vacuna se demostró que la utilización combinada de las vías oral e inyectable brinda protección más completa. También se efectuaron ensayos con otras cepas atenuadas de *S. Gallinarum*, pero las mismas no demostraron ser mejores que la cepa 9R. Las vacunas inactivadas que utilizan como inmunógeno las células enteras, no tienen uso generalizado debido a su poca efectividad. Sin embargo, experimentalmente se demostró que si se usan las proteínas purificadas de la membrana externa de *S. Gallinarum*, existe una mayor exclusión de las salmonelas patógenas de los órganos internos que cuando se emplea la cepa 9R.

Actualmente, uno de los problemas cruciales de la avicultura mundial es el control de la paratífosis debida a *S. Enteritidis*, sobre todo debido a la importancia que adquirió este serovar zoonótico. Si bien la cepa 9R ofrece cierto grado de protección cruzada contra *S. Enteritidis*, resulta insuficiente para impedir su diseminación. Por ello, se están desarrollando investigaciones en busca de cepas atenuadas de *S. Enteritidis* que efectivamente pueden controlar esta paratífosis.

Bibliografía

- Barrow PA, Jones MA, Thomson N. *Salmonella*. 2010. En: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, 4th edition. En: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. Ames, Wiley-Blackwell, pp 231-65.
- Barrow PA, Jones MA, Smith AL, Wigley P. The long view: *Salmonella* – the last forty years, *Avian Pathol*. 2012; 41(5):413-20, DOI: 10.1080/03079457.2012.718071.
- Becker WM, Kleinsmith LJ, Hardu J. 2007. El mundo de la célula. 6th edición. Madrid, Pearson Addison Wesley.
- Calman A MacLennan, Laura B Martin, Francesca Micoli. Vaccines against invasive *Salmonella* disease, *Hum Vaccin Immunother*.2014; 10(6):1478-93, doi: 10.4161/hv.29054.
- Chacana PA, Terzolo HR. Revisión sobre Pullorosis y Tifosis aviar. Nuevos enfoques para viejos conceptos. *Rev Med Vet*. 2003; 84(1): 14-20.
- Costa TR, Filisberto-Rodrigues C, Meir A, Prevast MS, Redzej A, Trokter M, Waksman. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(6):343-59. doi: 10.1038/nrmicro3456.
- de Jong HK, Parry CM, van der Poll T, Wiersinga WJ. Host– Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. *PLoS Pathog*. 2012; 8(10): e1002933. doi:10.1371/journal.ppat.1002933.
- Figueroa Ochoa IM, Verdugo Rodríguez A. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Rev Latinoam Microbiol*. 2005; 47(1-2):25-42.
- Groisman EA, Mouslim C. Molecular mechanisms of *Salmonella* pathogenesis. *Curr Opin Infect Dis*. 2000; 13:519-22.
- Guntram A. Grassla, Brett Finlaya B. Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections *Curr Opin Gastroenterol*. 2008; 24:22-26.
- Manual de la OIE sobre animales terrestres. Salmonelosis Cap. 2.9.9.2008 p. 1-18.
- Ohl ME, Miller SI. *Salmonella*: A model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med*. 2001; 52:259-74.
- Pieters J. Evasion of host cell defense mechanisms by pathogenic bacteria. *Curr Opin Immunol*. 2001; 13:37-44.
- Sánchez Jiménez MM, Cardona Castro NM. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Infectio*. 2003; 7(1): 22-9.
- Thiennimitr P, Winter SE, Bäumlér AJ. *Salmonella*, the host and its microbiota. *Curr Opin Microbiol*. 2012; 15(1):108-114. doi:10.1016/j.mib.2011.10.002.

Patogenicidad microbiana en medicina veterinaria / Fabiana A. Moredo ... [et al.] ; coordinación general de Fabiana A. Moredo ; Alejandra E. Larsen ; Néstor Oscar Stanchi. - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata ; La Plata : EDULP, 2018.

Libro digital, PDF - (Libros de cátedra)

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-950-34-1725-6

1. Veterinaria. 2. Bacterias. 3. Virus. I. Moredo, Fabiana A. II. Moredo, Fabiana A. , coord. III. Larsen, Alejandra E. , coord. IV. Stanchi, Néstor Oscar, coord.
CDD 636.089

Diseño de tapa: Dirección de Comunicación Visual de la UNLP

Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata
47 N.º 380 / La Plata B1900AJP / Buenos Aires, Argentina
+54 221 427 3992 / 427 4898
edulp.editorial@gmail.com
www.editorial.unlp.edu.ar

Edulp integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN)

Primera edición, 2019
ISBN 978-950-34-1725-6
© 2019 - Edulp

n
naturales



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA