

Agentes infecciosos

Ahidé López Merino*

El mundo que nos rodea está constituido de un complejo y denso contenido de microbios que incluye bacterias, hongos, parásitos y virus, sin embargo solo una muy pequeña fracción ha sido catalogada, del resto se conoce poco porque no son cultivables. La vasta mayoría de este grupo no es capaz de producir daño al hombre.

La virulencia es el resultado de una estrategia que ha evolucionado y se ha ido especializando para permitir a los microorganismos replicarse dentro del hospedero pero que inevitablemente le produce daño. Este pudo haber sido el caso de muchas bacterias patógenas que evolucionaron junto con sus hospederos. Estas estrategias especializadas de replicación son raras entre los organismos que no han evolucionado en contacto directo con humanos u hospederos muy relacionados. Sin embargo, existen ejemplos de bacterias como *Legionella pneumophila* que pasó de su medio ambiente acuático a una torre de enfriamiento de aire acondicionado de un hotel causando el primer brote, del que se tuvo noticia

Los reservorios de los patógenos, su persistencia en habitats no humanos, su resistencia a antibióticos naturales y a los desarrollados por el hombre y sus factores de

virulencia deben ser estudiados con mucho interés para evitar el contagio, la diseminación del patógeno y con el fin de desarrollar mejores métodos de prevención y control. En este simposio se eligieron tres bacterias que tienen historias de adaptación distintas: *Brucella*, cuyos hospederos primarios son los mamíferos domésticos o silvestres, pero que puede afectar al hombre. En este caso, los animales infectados son la principal fuente de dispersión de la bacteria siendo las secreciones genitales o mamarias el principal vehículo de contaminación, en México es una de las zoonosis de mayor trascendencia. En segundo lugar se analiza a *Legionella pneumophila*, que como se mencionó con anterioridad, migró del medio ambiente al humano, actualmente ocasiona de 8,000 a 18,000 casos cada año en Estados Unidos, a la fecha se desconoce la importancia que puede tener en el país. En tercer lugar se menciona a *Haemophilus influenzae* que forma parte de la microbiota normal del humano, el cual es su único reservorio. Las cepas capsuladas del tipo b afectan especialmente a la población infantil en la que produce una colonización del tracto respiratorio superior y puede producir epiglotitis y meningitis.

Brucella

López-Merino A,* Contreras Rodríguez A*

La brucelosis es una enfermedad de animales que se transmite al humano de distribución mundial.⁴ Se calcula que ha existido desde hace 2000 años en el área mediterránea;⁵ debido a su localización geográfica se le conoce como fiebre de Malta o del Mediterráneo. La brucelosis es

una enfermedad de gran importancia en México ya que ocasiona grandes pérdidas económicas en la ganadería nacional. Afecta la salud de animales domésticos al producir abortos y epididimoorquitis en los machos, con frecuencia artritis, higromas, abscesos supurantes y pérdida de peso, en consecuencia, la productividad del animal se ve afectada.¹²

El hombre adquiere la bacteria por medio del contacto con los animales infectados, por sus excretas o productos del aborto, polvo, pelo o ambientes contaminados, a través de la piel erosionada o por salpicaduras a los ojos, y por el consumo de leche queso, crema u otros

* Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Carpio y Plan de Ayala S/N, Col. Sto. Tomás, Deleg. M. Hidalgo, 11340, México D. F., ahidelomerino@gmail.com

lácteos provenientes de animales con brucelosis. Además, puede presentarse la transmisión de persona a persona a través de transfusiones de sangre contaminada o trasplantes de tejidos infectados. Muy importante es la transmisión de *Brucella* de madre enferma al hijo lactante a través de la leche. Lo menos estudiado en el país, es la transmisión placentaria de *Brucella* que produciría el aborto del feto.^{11,13}

Las especies que infectan al hombre son *B. melitensis*, que comúnmente afecta a la cabra y la oveja, *B. melitensis* es el agente responsable de la mayoría de los casos humanos diagnosticados por métodos bacteriológicos y es la más virulenta. *B. abortus*, responsable de la brucelosis bovina, por ser menos virulenta produce una infección leve y en muchos casos asintomática, está muy relacionada a la actividad profesional del individuo. *B. suis*, que afecta a los cerdos, causa lesiones destructivas localizadas y supurativas. *B. canis*, es poco virulenta para el hombre, cuando lo infecta produce bacteriemias o complicaciones de tipo supurativo.^{6,9} En la Tabla 1 se presenta las especies aisladas en el país hasta 1998.¹⁰

La virulencia de las especies de *Brucella* se fundamenta en la capacidad que poseen para evadir los mecanismos de defensa del huésped, sobrevivir y replicarse al interior de células fagocíticas profesionales, como los macrófagos y células no fagocíticas.¹⁵

La infección aguda en el hombre se presenta con fiebre, cefalea, artralgias y mialgias, la localización posterior del patógeno en diferentes órganos, da lugar a neurobrucelosis, adenopatías, complicaciones osteo-articulares, genitales o cardíacas entre otras. La brucelosis crónica cursa con síntomas usualmente vagos, y así transcurre la enfermedad por meses y años, situación que dificulta el diagnóstico. Además, aunque se suministren antibióticos específicos al paciente, la infección tarda en erradicarse debido, entre otras razones, a la localización intracelular de la bacteria que la coloca fuera del alcance de la respuesta inmune humoral y los antibióticos.^{1,6,7}

Brucella con fenotipo liso posee una membrana externa y una interna separadas por el espacio periplásmico y la peptidoglicana ligada a la membrana externa por una lipoproteína. La membrana externa está constituida por el lipopolisacárido (LPS), proteínas de membrana externa, lípidos y polisacáridos entre otros componentes. El LPS liso de *Brucella*, ampliamente estudiado por considerarse un factor de virulencia, contiene una cadena polisacáridica, conocida como antígeno O, que guarda similitud con el de otras bacterias Gram negativas, con las que existe cruce antigénico. El antígeno O es un componente expuesto en la superficie e inmunodominante de las cepas lisas virulentas;¹⁵ induce una res-

puesta temprana de anticuerpos aglutinantes de la clase IgM, seguidos por los de clase IgG, de gran utilidad diagnóstica en la fase aguda. Sin embargo, se ha observado la persistencia de anticuerpos anti-LPS en un número importante de individuos que se infectaron con *Brucella*, aún meses después de concluir la terapia y de la recuperación clínica.^{1,2,7} En consecuencia, se genera confusión cuando se detectan con las pruebas serológicas rutinarias. Lo anterior, ha llevado a la búsqueda de otras moléculas que sirvan como marcadores de la enfermedad, ya que en forma práctica es difícil distinguir entre pacientes con brucelosis activa, crónica o individuos infectados.²

Se realizó un estudio tendiente a determinar la respuesta de anticuerpos IgG hacia el extracto crudo de *B. melitensis* (RCM-M16) en pacientes que iniciaron con brucelosis aguda. Se comparó con dos grupos uno de individuos provenientes de una zona endémica (ordeñadores de vacas y sus familiares) y un grupo de individuos aparentemente sanos. En la Figura 1 se observan los niveles de anticuerpos IgG que fueron detectados en 25/27 (92.5%) pacientes con brucelosis aguda. Uno

Tabla 1. Cepas de *Brucella* aisladas e identificadas en el territorio nacional.

| <i>B. melitensis</i> | <i>B. abortus</i> | <i>B. suis</i> | <i>B. canis</i> |
|----------------------|-------------------|----------------|-----------------|
| 92.1% | 6.56% | 1.05% | 0.26% |

Fuente: Hernández Monroy I.,¹⁰ 1998. InDRE, SSA

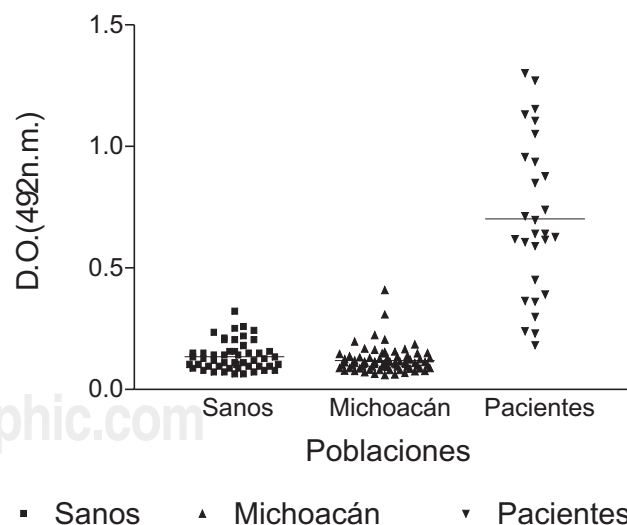


Figura 1. Determinación de anticuerpos IgG hacia componentes del antígeno RCM-M16 mediante ELISA indirecto en tres poblaciones en estudio

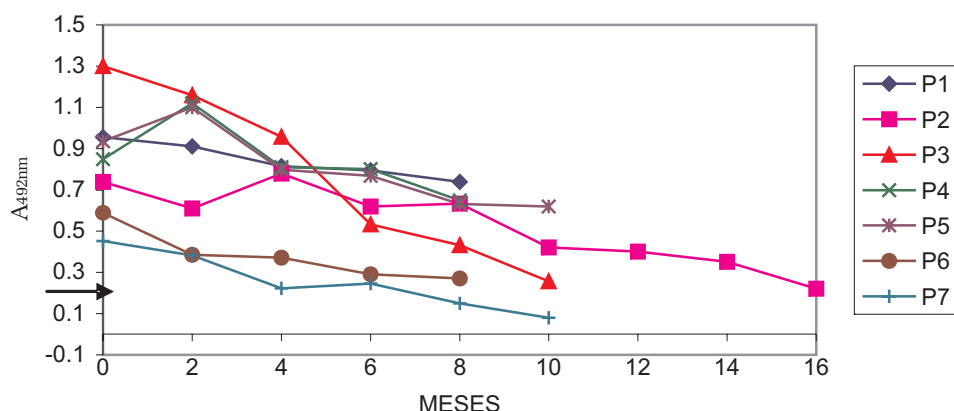


Figura 2. Valores de IgG hacia el antígeno RCM-M16 determinados por ELISA indirecto en el suero de siete pacientes con brucelosis. La flecha indica el valor de corte considerado para el ensayo.

de los que resultó negativo era aparentemente crónico y el otro se encontraba al inicio de la infección. Todos los individuos provenientes de una zona endémica resultaron negativos al igual que los individuos sanos. Los resultados sugirieron que la determinación de anticuerpos IgG, hacia el antígeno RCM-M16, era un método útil para diferenciar pacientes con brucelosis activa de individuos probablemente infectados, por convivir con animales con brucelosis.

Posteriormente se planeó hacer un seguimiento de algunos de los pacientes del grupo; se les determinó la IgG anti-componentes de RCM-M16 a lo largo de 8, 10 y 16 meses en el suero. Al graficar los valores de siete de los pacientes con brucelosis, se obtuvieron las curvas que se presentan en la Figura 2.

Se observa en todos los casos una tendencia hacia la desaparición de los anticuerpos IgG anti-RCM-M16 conforme transcurre el tiempo. Cabe mencionar, que todos los pacientes recibieron la terapia recomendada en la Norma NOM-022-SSA2-1994. De ellos, el P4 presentó un incremento de IgG en el segundo mes del estudio, que se consideró como recaída por lo que recibió otro esquema de terapia, posteriormente disminuyó la IgG al igual que en el resto de pacientes. Este patrón de comportamiento de los anticuerpos IgG es semejante al reportado por otros autores.^{1,2,7}

Con el propósito de identificar hacia que proteínas reaccionaban los anticuerpos IgG presentes en los sueros de los pacientes, se realizó una inmunotransferencia. Se encontró que en la primera muestra de cada paciente se reconocieron diferentes proteínas del extracto RCM-M16 principalmente: 2 proteínas mayores de 100 kDa, de 94, 65-60, 47-40, 30-35 y 14kDa. Se esperaba que hubiera un patrón común en los pacientes estudiados, sin embargo no se presentó en cambio se observó que el patrón de los individuos fue variable y estuvo en función del tiempo transcurrido antes de la primera visita al laboratorio.

Aquellos pacientes que acudieron después de un mes presentaron anticuerpos IgG hacia más proteínas, que los que acudieron a la semana. Existen pocos estudios en la literatura semejantes a éste, de entre ellos se mencionará el de Goldbaum y col.(1991), que reportan reconocimiento hacia las proteínas de membrana externa de 30 a 60 kDa, y hacia proteínas citoplasmáticas de 45-50 kDa. A partir de los resultados mencionados se logró purificar una proteína de 96 kDa, que era antigénica y que además poseía actividad de aminopeptidasa.³

Es indudable, que la identificación de antígenos de bacterias como *Brucella*, que inducen una respuesta humoral tan abundante y compleja, en la mayoría de los pacientes con brucelosis, tendrá aplicaciones importantes en el desarrollo de métodos diagnósticos y de vacunas.

REFERENCIAS

1. Ariza, J., T. Pellicer, R. Pallarés, A. Foz, and F. Gudiol. 1990. Specific antibody profile in human Brucellosis. Clin. Infect. Dis. 14: 131-140.
2. Baldi, P.C., S.E. Miguel, C.A. Fossati, and J.C.Wallach. 1996. Serological follow-up of human brucellosis by measuring IgG antibodies to lipopolysaccharide and cytoplasmic proteins of *Brucella* species. Clin. Infect. Dis. 22: 446-455.
3. Contreras Rodríguez A., B. Ramírez Zavala, A. Contreras, G. Schurig, N. Sriranganathan and A. López-Merino. 2003. Purification and characterization of an immunogenic aminopeptidase of *Brucella melitensis*. Infect. Immun. 71: 5239-5245.
4. Corbel, M. J. 1997. Brucellosis: an overview. Emerg. Infect. Dis. 3: 213-221.
5. Capasso L. 2002. Bacteria in two-millenia-old cheese, and related epizoonoses in Roman population. J. Infect. Dis. 45:122-127.
6. Estrada Aguilera A. Aspectos clínicos de la brucelosis humana, en: E. Luna y F. Suárez.(eds) III Foro Nacional de Brucelosis, Memorias, SAGAR, CONASAG, UNAM, OPS, México, 1998, pag. 47-51
7. Gazapo, E., J.L. Subiza, N. Baquero, and J.C.Gil. 1989. Changes in IgM and IgG antibody concentrations in brucellosis over time: importance for diagnosis and follow up. J. Infect. Dis. 159: 219-225.

8. Goldbaum, F.A., L. Morelli, J. Wallach, C.P. Rubi, and C.A. Fossati. 1991. Human brucellosis: Immunoblotting analysis of three *Brucella abortus* antigenic fractions allows the detection of components of diagnostic importance. *Medicina (Buenos Aires)* 51: 227-232.
9. Gur A, M.F. Geyi, et al. 2003. Complications of brucellosis in different age groups: a study of 283 cases in southeastern Anatolia of Turkey. *Yonsei. Med. J.*, 44: 33-44
10. Hernández M. I. Importancia de la brucelosis en salud pública, En: E. Luna y F. Suárez (eds) III Foro Nacional de Brucelosis, SAGAR, CONASAG, UNAM, OPS México, 1998, pag. 17-22.
11. López-Merino A. Brucellosis in Latin America. Young EJ, Corbel MH, (eds). *Brucellosis: clinical and laboratory aspects*. Boca Ratón. CRC Press Inc., 1989, pag. 151-161
12. Luna Martínez E. & C. Mejía Terán. 2002. Brucellosis in Mexico: current status and trends, *Vet. Microbiol.* 90: 19-30.
13. Madkour M.M. Pregnancy and brucellosis, en, Madkour M.M. (ed) *Brucellosis*. Butterworths Press, 1989, pag. 197-204.
14. Norma Oficial Mexicana. NOM-022-SSA2-1994. Para la prevención y control de la brucelosis en el hombre, en el primer nivel de atención. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 30 de noviembre de 1995.
15. Sanakkayala, N., A. Sokolovska, J. Gulani, H. HogenEsch, N. Sriranganathan, S. Boyle, G. Schurig and R. Vemulapalli. 2005. Induction of antigen-specific Th1-type immunoresponses by gamma-irradiated recombinant *Brucella abortus* *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 1429-1436.

La enfermedad de los legionarios

Luis Ángel Sapián López*

* Laboratorio de Urgencias Epidemiológicas del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Prolongación de Carpio No. 470, Col. Santo Tomás. 11340 México D.F.

En el mes de julio de 1976, en la ciudad de Filadelfia, Pensilvania, tuvo lugar la 58ª Convención de la Legión Americana en el Hotel Bellevue Straford. En el transcurso de los días, de los 4,400 asistentes entre miembros y acompañantes, se presentaron 182 casos de neumonía, de los cuales fallecieron 29 pacientes. Durante el estudio epidemiológico se descubrieron 34 casos más que produjeron otras cinco muertes. En ese mismo año se había documentado la transmisión de humano a humano de una cepa de virus de influenza porcina. También se celebraba el bicentenario de la Independencia de los EUA. La situación hacía sospechar de causas naturales o incluso de un atentado. El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta, inició un estudio epidemiológico y microbiológico sin precedentes para determinar la causa del brote. La información era desconcertante: no había patrones de intoxicación por alimentos, personas que compartieron la habitación con las que enfermaron permanecieron asintomáticas. Las opiniones de grupos de expertos eran contradictorias.

Para identificar el agente etiológico, se examinaron muestras de tejido y suero de los pacientes buscando evidencia de toxinas, bacterias, virus, hongos, clamidias y rickettsias. Del tejido pulmonar *post mortem* de cuatro de seis enfermos, que fue inoculado en animales de laboratorio, se aisló un bacilo Gram negativo. El bacilo pudo ser transferido a embriones de pollo. Las bacterias crecidas sirvieron como antígeno para probarlo con los sueros de pacientes por inmunofluorescencia indirecta, resultaron positivas 101/111 de las muestras.^{3,9} Así se identificó, por primera

vez en 1977, a un bacilo Gram negativo de crecimiento aerobio, como la causa de un brote de neumonía que ocasionó 34 muertes en la Convención de Legionarios de 1976. A la bacteria se denominó por ello *Legionella pneumophila* y a la neumonía atípica se le llamó "enfermedad de los legionarios". El procedimiento diagnóstico mencionado fue positivo en 54 muestras de casos esporádicos recientes de neumonía severa y, retrospectivamente, en sueros de pacientes de dos brotes de enfermedad respiratoria no resueltos. Indudablemente, esta bacteria había causado brotes de neumonía previos, pero el microorganismo aún no se conocía.^{3,9}

Actualmente, se reconocen dos formas clínico-epidemiológicas de la infección por *Legionella*: "enfermedad de los legionarios", o forma neumónica y "fiebre de Pontiac", forma no neumónica. Ambas se caracterizan inicialmente por anorexia, vómito, mialgia y cefalea, seguidas en el plazo de un día, por fiebre en aumento y escalofríos. El periodo de incubación es de 2 a 10 días. En la forma neumónica son frecuentes la tos no productiva, el dolor abdominal, la diarrea, la confusión y el delirio. No es posible distinguir clínicamente la neumonía causada por *Legionella* de otros tipos de neumonía. La fiebre de Pontiac es clínicamente similar a la influenza, no está asociada a neumonía y la literatura señala que es una reacción a antígeno inhalado y no a las bacterias mismas.⁴

Se han identificado 42 especies y más de 64 serogrupos. De ellas, 12 especies han sido asociadas a casos de infección humana, siendo *Legionella pneumophila* la responsable de más del 90% de los casos de legionelosis, seguida por *L. longbeachae*, *L. bozemanii* y *L. micdadei*. El

serogrupo 1 es responsable de más del 80% de las infecciones por *L. Pneumophila*.¹⁶

Los brotes de legionelosis son muy publicitados por la prensa, sin embargo, se presentan casos aislados no asociados con ningún brote. Los brotes son más frecuentes en el verano y al inicio de otoño aunque los casos aislados pueden ocurrir durante todo el año. La letalidad va del 5 al 30%. Se debe sospechar de legionelosis en los casos de neumonía vinculados a datos epidemiológicos como: un viaje reciente, hospitalización, asistencia a reuniones e inmunosupresión, entre otros. También se considera, la edad mayor de 50 años, el sexo masculino, el tabaquismo y el consumo de alcohol entre los factores de riesgo.⁷

Legionella es un parásito de protozoarios de vida libre, por lo que se encuentra en pequeñas concentraciones en fuentes naturales de agua y puede ser detectada en baja cantidad en ríos, lagos, aguas termales y arroyos, pudiendo sobrevivir en condiciones ambientales muy diversas. Para que su concentración aumente lo suficiente (más de 10,000 UFC/ ml) y cause riesgo a los humanos, debe colonizar las redes de distribución de agua potable, sistemas hídricos contruidos por el hombre, como torres de refrigeración y sistemas de distribución de agua sanitaria, donde encuentra condiciones de temperatura idóneas para su multiplicación (25-45° C), protección física y nutrientes apropiados.

A partir de estos lugares, *Legionella* puede infectar a las personas si el agua es diseminada en forma de aerosoles, de manera que la bacteria pueda ser transportada por el aire en pequeñas gotas e ser inhalada por las personas. Por lo tanto, la vía de transmisión es aérea. Nuevas evidencias sugieren que otra forma de contraer legionelosis es por medio de la bronco aspiración de la bacteria hacia los pulmones, para causar neumonía. Esto es, las secreciones en la boca en vez de ir hacia el esófago y estómago, erróneamente entran a los pulmones. Aunado a esto, los mecanismos protectores para prevenir la bronco aspiración son deficientes en pacientes que fuman o tienen enfermedad pulmonar.¹¹

El diagnóstico confirmatorio se basa en el aislamiento e identificación del microorganismo de muestras ambientales o humanas, en medios con y sin cisteína (BCYE), por la tinción de inmuno-fluorescencia directa del tejido afectado, por detección de antígenos de *L. pneumophila* serogrupo 1 en orina por inmunoensayo enzimático (ELISA), radio inmunoanálisis (RIA) o por medio del incremento del cuádruplo o más en el título de anticuerpos inmunofluorescentes entre el suero de la fase aguda y aquél extraído tres a seis semanas después.¹⁵ Para las muestras ambientales, se utiliza el cultivo de agua y aerosoles, así como reacción en cadena de la polimerasa (PCR).¹⁴

En cuanto al tratamiento, la eritromicina es el medicamento de elección; también son eficaces los macrólidos

nuevos como la claritromicina y azitromicina, así como las quinolonas como ciprofloxacina y levofloxacina.^{10,13}

Es recomendable llevar a cabo controles de torres de refrigeración, condensadores evaporadores, aparatos de enfriamiento, humectadores, sistemas de distribución de agua caliente sanitaria y baños de burbujas, grifos y regaderas y cisternas, entre otros.¹

Aproximadamente de 8,000 a 18,000 casos se reportan anualmente a los CDC en el país vecino, pero se estima que más de 25,000 casos de la enfermedad ocurren cada año en el mundo, causando más de 4,000 muertes.⁵

En México sólo se han reportado dos casos con diagnóstico clínico de neumonía por *Legionella*, sin pruebas de laboratorio confirmatorias y ninguno por aislamiento del agente causal. Estos fueron del Estado de México y Guerrero.^{8,12} En contraste, el European Working Group for Legionella Infections (EWGLI), una organización no gubernamental que hace vigilancia epidemiológica de los casos de legionelosis que ocurren en Europa desde 1987, asocia 46 casos ocurridos en turistas con sus estancia en México entre 1990 y 2005.⁶

Hasta el momento, no ha sido notificado ningún brote de legionelosis en México, ni la bacteria ha sido aislada de ningún caso de neumonía, sin embargo es necesario investigar la presencia de ésta bacteria en nuestro país, para iniciar las medidas que permitan controlar su aparición. Si el primer brote documentado en el mundo se dio en un Hotel, no es en estos lugares donde se circunscribe el problema, ya que el brote con mayor número de casos se registró en un hospital de Murcia, España en el año 2002 con más de 500 casos.²

Si entendemos la vigilancia epidemiológica como información para la acción, no podremos actuar oportunamente si no iniciamos el primer paso: la detección de este microorganismo en México.

REFERENCIAS

1. Atlas, Ronald M. 1999. *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. Environ Microbiol: 1, 283-293.
2. Cano Portero, R. & C.A. Joseph. 2001. Community outbreak of legionnaires' disease in Murcia, Spain Eurosurveillance Weekly. 5:010712.
3. Fraser, D.W., T.R. Tsai, W., Orenstein, & cols. 1977. Legionnaires disease: description of an epidemic of pneumonia. N Engl J Med 297: 1189-1197.
4. Glick, T.H., M.B., Gregg, B. G., Mallison, W.W. Jr., Rhodes, & I. Kassanoff. 1978. Pontiac fever: an epidemic of unknown etiology in a health department. I. Clinical and epidemiologic aspects. Am J Epidemiol 107: 149-160.
5. http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/legionellosis_t.html
6. http://www.ewgli.org/data/data_tables/year_onset_country_travel.asp

7. Marston, B.J., H.B., Lipman, & R.F. Breiman. 1994. Surveillance for Legionnaires' disease: risk factors for morbidity and mortality. Arch Intern Med 154: 2417-2422.
8. Marín, V. I. & L. D. Montes, 1991. Neumonía por *Legionella pneumophila*. Informe de un caso. Inv Med Int 17:205-209.
9. Mc Dade, J.E., Shepard, C.C., Fraser, D.W., Tsai, T.R., Redus, M.A. & W.R., Dowdle. 1977. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. N Engl J Med 297: 1197-1203.
10. Sabria, M., Pedro-Botet, M. L., Gomez, J., Roig, J., Vilaseca, B., Sopena, N., Banos, V., for the Legionnaires Disease Therapy Group. 2005. Fluoroquinolones vs macrolides in the treatment of Legionnaires disease. Chest 128: 1401-1405.
11. Tison, D.L. & R.J. Seidler, 1983. *Legionella*: incidence and density in potable drinking water. Appl Environ Microbiol 45: 337-339.
12. Torrijos, J.H., A., Lisker-Halpert, C.N., Pérez Redondo, K.K., Fujikami, S.V. Figueroa, & L., Castillo. 1995. La neumonía por *Legionella pneumophila*. Informe del segundo caso en México. Gac Méd Mex 131: 587-590.
13. Tsakris, A. S. Alexiou-Daniel, E. Souliou and A. Antoniadis .1999. In-vitro activity of antibiotics against *Legionella pneumophila* isolates from water systems J Antimicrob Chemother 44, 693-695.
14. Villari, P., Mott, E., Farullo, C., Torre I. 1998. Comparison of conventional culture and PCR methods for the detection of *Legionella pneumophila* in water. Lett Appl Microbiol: 27: 106-110.
15. Waterer GW, Baselski VS, Wunderink RG. 2001. *Legionella* and community-acquired pneumonia: a review of current diagnostic tests from a clinician's viewpoint. Am J Med; 110: 41-48.
16. Yu, V.L., J.F., Plouffe, M.C., Pastoris, J.E., Stout, M., Schousboe, A., Widmer, J., Summersgill, T., File, C.M., Heath, D.L., Paterson, & A. Cheresky. 2002. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. J Infect Dis 186:127.

Identificación de las enzimas TEM y ROB-1 en cepas de *Haemophilus influenzae* aisladas de portadores preescolares vacunados

Silvia Gabriela Sergio Bonilla,* Patricia Lozano Zarain,** Ygnacio Martínez Laguna,** Rosa del Carmen Rocha Gracia*,**

* Facultad de Medicina, Biomedicina

** Postgrado en Microbiología, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias, Complejo de Ciencias, Edificio 76, Tercer piso, Ciudad Universitaria. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

* Autor responsable. E-mail: rochagra@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

Haemophilus influenzae (Hi) es una bacteria de importancia médica por la amplia variedad de padecimientos que provoca especialmente en la población infantil, desde la colonización asintomática del tracto respiratorio superior hasta infecciones invasivas como es el caso de la meningitis.¹ El tratamiento que se emplea en niños y en adultos se ve afectado por la resistencia a antibióticos betalactámicos que se ha convertido en un gran problema de Salud Pública.²

Son dos los mecanismos principales con los que cuenta *H. influenzae* que le otorgan resistencia a los antibióticos β -lactámicos que son los antimicrobianos de primera elección: la producción de enzimas que hidrolizan el antibiótico llamadas β -lactamasas y el cambio en las proteínas de unión a las penicilinas o PBPs.³ El más frecuente es la producción de la β -lactamasa de tipo TEM-1;² sin embargo hay cepas que producen la β -lactamasa tipo ROB-1, aunque en menor frecuencia.^{4,5} La prevalencia de la expresión de TEM sobre ROB-1 se ha reportado en diferentes países como Canadá y España,^{6,7} en México no existen reportes actuales de esta prevalencia.

El objetivo del trabajo fue determinar la producción fenotípica de la enzima β -lactamasa mediante la prueba de la Cefinasa y amplificar los genes que codifican para las β -lactamasas TEM y ROB-1 en cepas de *H. influenzae* aisladas de niños portadores preescolares vacunados contra *H. influenzae* tipo b.

METODOLOGÍA

Se tomaron 296 muestras de exudados faríngeos de niños menores de 6 años de edad, vacunados contra *H. influenzae* serotipo b. El aislamiento y la identificación de género y especie se realizó utilizando los medios GHBL, BHI+Fildes 5% y TSA con factores X (Hemina) y V (NAD).⁸ La serotipificación de las cepas se realizó con el reactivo de coaglutinación (Phadebact, *Haemophilus* Test. Boule, Sweden) y la Biotipificación con las pruebas bioquímicas de producción de indol, urea y descarboxilación de la ornitina.⁸ Se realizaron perfiles de susceptibilidad hacia los antimicrobianos recomendados por la NCCL:^{9,10} amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina, ampicilina/sulbactam, aztreonam, cefaclor, cefotaxima,

caftazidima, ceftriaxona, cefuroxima, cloranfenicol, ciprofloxacina, imipenem, rifampicina, tetraciclina, trimetoprim/sulfametoxazol, ofloxacina, azitromicina, cefepima y cefixima, mediante el método de Kirby-Báuer. A las cepas resistentes a los antimicrobianos β -lactámicos se les investigó la producción de β -lactamasa por el método en disco de la Cefinasa (Cefalosporina colorida, laboratorios BBL). Posteriormente, mediante PCR y utilizando los oligonucleótidos TEM (5'-TGG GTG CAC GAG TGG GTT AC -3' y 5'-TTA TCC GCC TCC ATC CAG TC -3') y ROB (5'-ATC AGC CAC ACA AGC CAC CT -3' y 5'-GTT TGC GAT TTG GTA TGC GA -3') se procedió a amplificar los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{ROB}^{6,4,2}

RESULTADOS

Se aislaron 152 cepas de *H. influenzae*, siendo 40 (26.31%) polivalentes y 112 (73.68%) No tipificables. No se encontraron cepas de serotipo b. Los biotipos más frecuentes fueron el I y el II. Se obtuvo el 35% de cepas multirresistentes (resistentes a más de cinco antibióticos). Se hallaron 32 (21.05%) cepas cefinasa positivas, de éstas, 30 se sometieron a PCR y 20 (66.66%) amplificaron *bla*_{TEM} (Fig. 1). De acuerdo a los perfiles de susceptibilidad y resistencia se seleccionaron 15 cepas resistentes a antibióticos β -lactámicos (ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina-sulbactám y cefaclor) y con fenotipo de cefinasa negativas de las cuales 10 (66.66%) amplificaron *bla*_{TEM}. Ninguna de las cepas ensayadas amplificó para β -lactamasa ROB-1.

DISCUSIÓN

El porcentaje de niños portadores de cepas de *H. influenzae* menores de 6 años fue del 37.83% en este estudio, que difiere del 21% reportado por Villaseñor y colaboradores en 1996, y se asemeja a lo reportado por Rocha e Iglesias en 1997, quienes describieron una prevalencia entre el 40.12 al 74.5% de portadores.^{11,12} La resistencia a β -lactámicos en infecciones por *H. influenzae* ha sufrido un incremento a nivel mundial y en este estudio así se demuestra, ya que la prevalencia de cepas *H. influenzae* cefinasa positivas (21.05%) es mayor a la reportada en el estudio previo realizado por Rocha e Iglesias en 1997 (12%) en niños portadores no vacunados. El porcentaje encontrado resultó muy semejante al reportado en el 2002 y realizado en el Hospital Infantil de México Federico Gómez,¹³ pero resulta menor al encontrado en un estudio similar en Francia, donde se obtiene un 45% de cepas cefinasa positivas.² La amplificación del gen *bla*_{TEM} se logró en el 66.66% de las cepas de *H. influenzae* cefinase positivas. Molina y col, en 2003 reportaron que no todas las cepas cefinasa positivas de su estudio amplificaron el gen *bla*_{TEM} y las

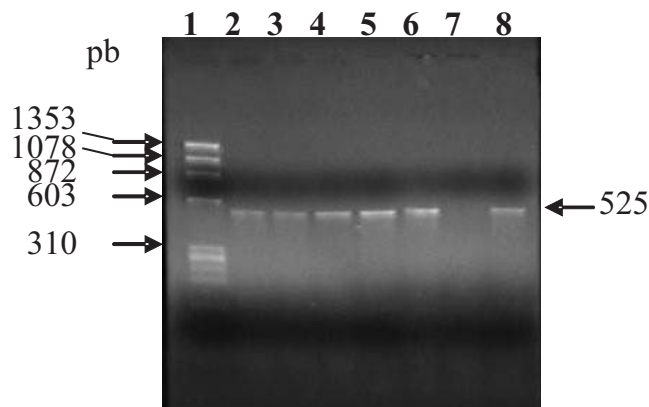


Figura 1. Amplificación del gen *bla*_{TEM}. Carril 1: Marcador de peso molecular; carriles 2 al 6 cepas de *H. influenzae* obtenidas de niños portadores preescolares vacunados mostrando un amplificado de 525 pb. Carril 7 cepa de *H. influenzae* 49247 ATCC resistente a la ampicilina, β -lactamasa negativa; carril 8 cepa de *H. influenzae* 33930 ATCC resistente a la ampicilina, β -lactamasa positiva.

describe como cepas que poseen otra β -lactamasa no detectada en estos aislados. Otro hallazgo interesante fue que el 66.66% de las cepas resistentes a antibióticos β -lactámicos y cefinasa negativas amplificaron el gen *bla*_{TEM}. En ese mismo estudio, se encontraron cepas similares que resultaron negativas a la prueba fenotípica de la cefinasa pero que amplificaron el gen y las describieron como cepas que pudieran poseer pero no expresar el gen, debido a que este está truncado, lo cual fue corroborado por estudios de secuenciación de los fragmentos amplificados. Con base en los resultados, aquí descritos, en las cepas que codifican pero no expresan la enzima β -lactamasa TEM, sugerimos que podría existir una delección en este gen por lo que se deben realizar estudios de secuenciación.

Por otro lado se encontró una frecuencia nula del gen *bla*_{ROB} en cepas de *H. influenzae*, a diferencia de otros estudios que han descrito una frecuencia del 7 al 9.3%.^{6,4}

Las pruebas de rutina basadas en características fenotípicas no siempre detectan la producción de la enzima β -lactamasa, de ahí la importancia de emplear pruebas moleculares en el diagnóstico, que nos lleven a identificar el genotipo de la enzima.

REFERENCIAS

1. Booy R & J. S. Kroll. 1997. Is *Haemophilus influenzae* finished? J. Antimicrob. Chemother. 40:149-153.
2. Dabernat H., C. Delmas, M. Seguy, R. Pelissier, G. Faucon, S. Bennamani & C. Pasquier. 2002. Diversity of β -lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. Antimicrob. Agents Chemother. 46(7):2208-2218.

3. Jorgensen J. H. 1992. Update on mechanisms and prevalence of antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. Clin. Infect. Dis. 14:1119-1123.
4. Karlowsky J. A., G Verma, G. G. Zhanel & D. J. Hoban. 2000. Presence of ROB-1 β -lactamase correlates with cefaclor resistance among recent isolates of *Haemophilus influenzae*. J. Antimicrob. Chemother. 48: 871-875
5. Casagrande, S.T., E.J. Vicente, I.M. Landgraf & A. M. M. Kobata. 2000. Antimicrobial resistance patterns of *Haemophilus influenzae* isolated from patients with meningitis in Sao Paulo, Brazil. Brazilian J. Med. Biol. Res. 33: 295-300.
6. Scriver S.R., S.L. Walmsley, C. L. Kau, D. J. Hoban, J. Brunton, A. McGeer, T.C. Moore, E. Witwicki, Canadian *Haemophilus* study group & D. E. Low. 1994. Determination of antimicrobial susceptibilities of Canadian isolates of *Haemophilus influenzae* and characterization of their β -lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 38:1678-1680.
7. Molina J. M., J. Córdoba, A. Monsoliu, U. Diosdado & M. Gobernado. 2003. *Haemophilus influenzae* and betalactam resistance: Description of *bla*_{TEM} gene deletion. Rev. Esp. Quimioterap. 16(2):195-203.
8. Sosa Iglesias E. G., S. Giono Cerezo, & A. Escobar Gutierrez. 1992. Manual de procedimientos para el aislamiento e identificación de *Haemophilus*. Publicación técnica del INDRE #19.SSA, México D. F.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1990. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 4th information supplement. NCCLS document M100-54. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
11. Villaseñor Sierra A., E Herrera-Basto, P. Vázquez-Salazar, JA Arroyo Moreno & JI Santos Preciado. 1993. Prevalencia del estado de portador de *Haemophilus influenzae* en niños de Ciudad Nezahualcóyotl, Estado de México, México. Salud Pùb. Mex. 38:87-93.
12. Rocha Gracia R. C. y Sosa Iglesias E. G.1997. Portadores de *Haemophilus influenzae* en guarderías de las ciudades de Puebla y Minatitlán. Rev. Enf. Inf. Ped. Méx. 10(39): 80-86
13. Sepúlveda M.E., L.V. Jiménez Rojas, M.L.E Espinosa. Prevalencia de serotipos en *Haemophilus influenzae* invasivos en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, durante el período de 1997 a 2000. 2002. Boletín Médico del Hospital Infantil. 59(9):611-612.

Correspondencia:

Ahidé López Merino.

Departamento de Microbiología,
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas,
I.P.N. Carpio y Plan de Ayala S/N,
Col. Sto. Tomás, Deleg. M. Hidalgo, 11340,
México D. F.,
ahidelomerino@gmail.com