

Revista Mexicana de Patología Clínica

Volumen
Volume **49**

Número
Number **3**

Julio-Septiembre
July-September **2002**

Artículo:

Diagnóstico bacteriológico del ántrax

Derechos reservados, Copyright © 2002:
Federación Mexicana de Patología Clínica, AC

Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

Others sections in this web site:

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Medigraphic.com

Imágenes de patología clínica

Diagnóstico bacteriológico del ántrax

Palabras clave: Ántrax, diagnóstico bacteriológico, *Bacillus anthracis*.

Key words: Anthrax, bacteriological diagnosis, *Bacillus anthracis*.

Recibido: 12/01/2002

Aceptado: 08/03/2002

Teodoro Carrada Bravo*

* Jefe de Educación Médica e Investigación.
Hospital General de Zona y Medicina Familiar 2,
Intituto Mexicano del Seguro Social. Irapuato, Guanajuato, México.

Correspondencia
Prof. Dr. Teodoro Carrada Bravo
Av. Reforma 702 Fraccionamiento Gámez
C.P. 36670, Irapuato, Guanajuato, México.
E-mail: teocamx@yahoo.es

Resumen

El *Bacillus anthracis* es un bastoncillo no-móvil, grampositivo, capaz de formar esporas centrales, las colonias son no-hemolíticas con aspecto de vidrio pulido, y cuando se inocula sobre el agar nutritivo añadido de bicarbonato al 0.7%, a temperatura de 37 °C, y en atmósfera de bióxido de carbono al 10%, la bacteria sintetiza la cápsula de poli-D ácido glutámico, y en estas colonias mucoides la cápsula puede teñirse con azul de metileno. Los hemocultivos realizados en pacientes con carbunco sistémico casi siempre resultan positivos, y debido a la existencia de cepas resistentes a la penicilina, incluso las bacterias modificadas genéticamente, se debe realizar la prueba de sensibilidad frente a los antibióticos en todos los aislamientos clínicos. Los métodos diagnósticos más recientes como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y la inmunotinción de las biopsias son herramientas útiles en el laboratorio clínico. Los factores de virulencia del *B. anthracis* son codificados por dos plasmidos, y los genes de la toxina están formados por el antígeno protector, el factor letal, y el factor edemátigeno que puede dañar las funciones del macrófago (mc), la toxina letal estimula a los mc para liberar el factor de necrosis tumoral a y la interleucina-1β que son los responsables de la muerte súbita en el carbunco septicémico.

Palabras clave: *Bacillus anthracis*, bacteriología, patogenia, diagnóstico, imágenes.

Summary

Bacillus anthracis is a nonmotile, gram-positive, aerobic rods that is capable of forming central spores. Colonies are nonhemolytic, often looking like ground glass, when inoculated onto nutrient agar containing 0.7 percent bicarbonate and grown overnight at 37 °C in the presence of 10 percent carbon dioxide, poly- D- glutamic acid capsule is formed. In these mucoid colonies the capsule can be stained with methylene blue. Blood cultures in cases of systemic anthrax infection are almost always positive, and because of the potential for penicillin resistant strain, including deliberately modified bacteria, antibiotic susceptibility testing should be performed on all isolates. New and rapid diagnostic techniques such as polymerase chain reaction and tissue immunostaining may become very useful in the clinical laboratory setting. The virulence factor of *B. anthracis* are encoded by two plasmids, the exotoxin gene is composed of protective antigen, lethal factor and edema factor, the macrophages (mc) function is impaired and lethal toxin stimulates the mc to release tumor necrosis factor a and interleukin- 1β, which are responsible for sudden death in septicemic anthrax.

Key words: *Bacillus anthracis*, bacteriology, pathogenesis, diagnosis, images.

141

Introducción

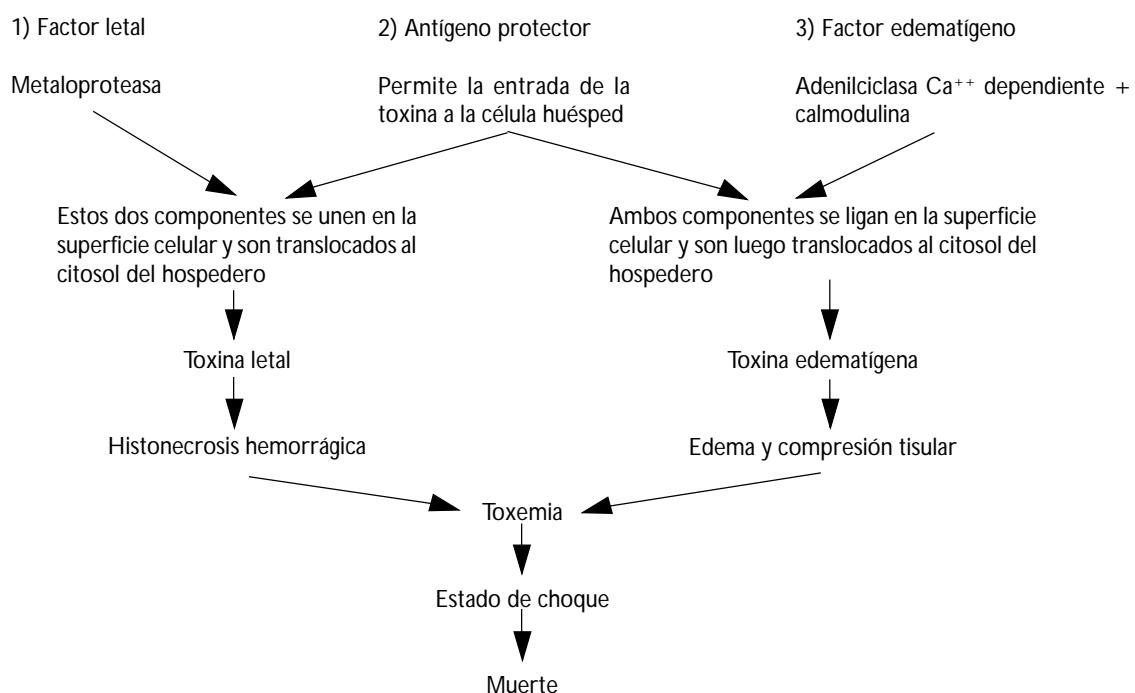
El ántrax es una zoonosis bacteriana de animales herbívoros —vacas, ovejas, cabras, caballos, búfalos, elefantes—, se transmite accidentalmente al hombre, se adquiere al ponerse en contacto con animales enfermos o muertos de fiebre esplénica o carbunclo o de productos contaminados, principalmente pelos, cueros, lana, huesos, etcétera. En fecha reciente se han registrado casos mortales de ántrax pulmonar relacionados con el superterrorismo, es decir, el uso indiscriminado y masivo de bacterias patógenas y/o sus esporas que potencialmente pueden causar elevada mortalidad y pánico colectivo.^{1,2}

Recolección y transporte de las muestras

Para recoger y transportar las muestras que se sospeche contengan *B. anthracis* o sus esporas, extremadamente resistentes y peligrosas, deben colocarse los especímenes en un recipiente de vidrio grueso cerrado herméticamente y empacado dentro de un tubo de plástico con etiqueta de advertencia muy visible. En estos casos deberán observarse en el laboratorio las más estrictas medidas de seguridad y protección para evitar accidentes que contaminen a los laboratoristas.^{3,4}

a) Plasmido p x 01 (de 184.5 pares de kilobases) genera 3 toxinas

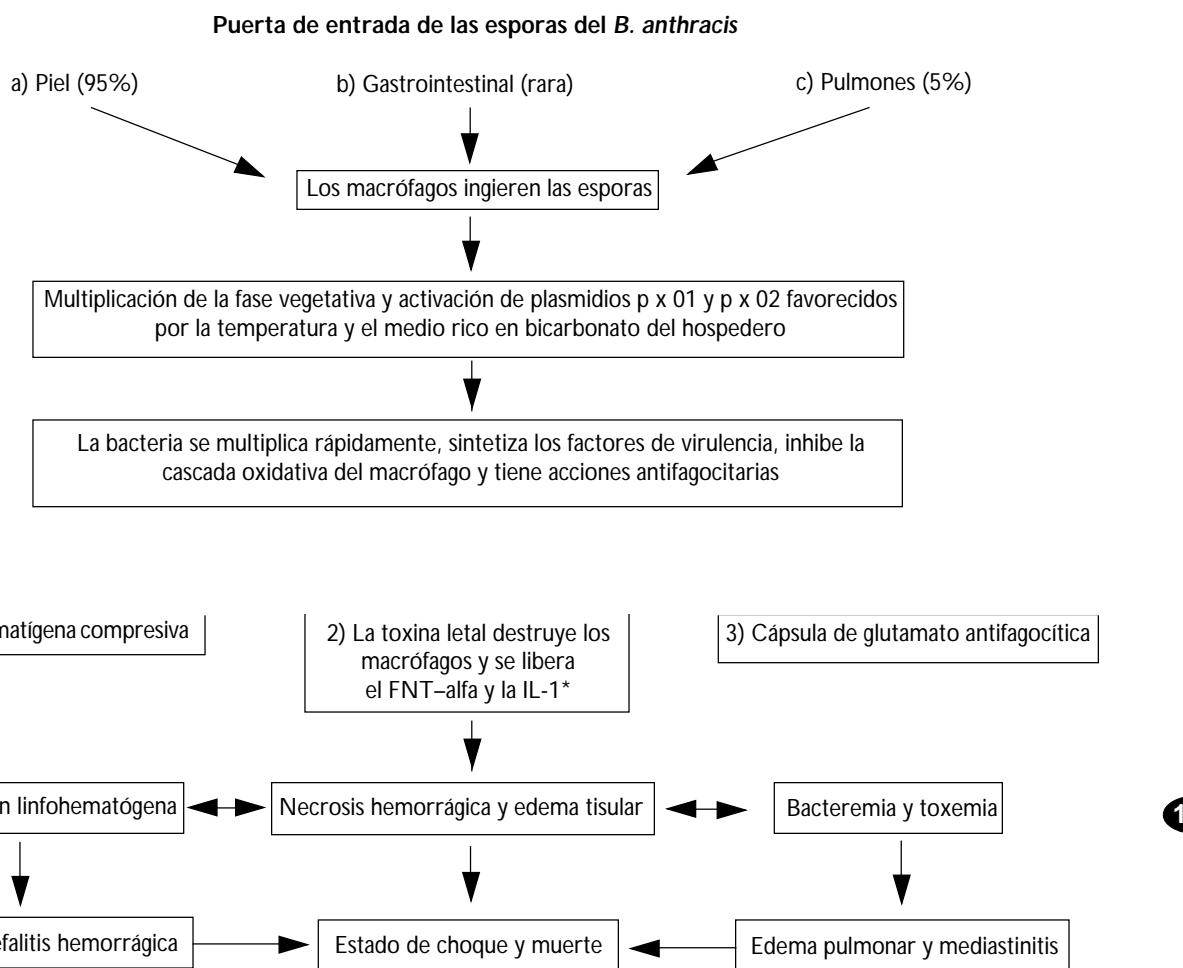
142



b) Plasmido p x 02 (de 95.3 pares de kilobases) codifica tres genes de la cápsula: cap B, cap C y cap A. Se sintetiza el polímero de poliglutamato que protege contra la fagocitosis.

Fuente: Carrada-Bravo T. Modificado de referencia núm. 22.

Figura 1. Patogenia de la toxinección en el ántrax, factores de virulencia bacteriana.



* FNT = Factor de necrosis tumoral; IL-1 = interleucina-1
Fuente: Carrada-Bravo T. Modificado de referencia núm. 22.

Figura 2. Patogenia y fisiopatología del ántrax.

Manejo de muestras clínicas

Gold encontró que la penicilina, administrada seis horas antes de recolectar las muestras, elimina las bacterias del líquido vesicular en las lesiones cutáneas y que la putrefacción destruye las formas vegetativas presentes en los cuerpos de los animales muertos.⁵ Las muestras más útiles para el diagnóstico son los frotis delgados para microscopia, los exudados, la sangre y el líquido cefalorraquídeo. Las autopsias realizadas "en campo" incrementan el ries-

go de infección de los veterinarios y contaminan el suelo lo que origina un foco de infección para el ganado, por esta razón no se recomienda efectuar tal procedimiento.⁶

Los hisopos de algodón estéril se empapan con líquido vesicular, sangre o líquido cefalorraquídeo (LCR) y se les coloca dentro de un tubo estéril con tapón de rosca; es deseable mantener las muestras refrigeradas pero no congeladas. En los humanos muertos por ántrax inhalado se pueden tomar muestras de ganglios media-



Figura 3. Médico veterinario de 34 años de edad de Pénjamo, Guanajuato quien manejó los cueros y pelos de vacas muertas por carbunclo hemorrágico. En la cara anterior del antebrazo izquierdo presentó una pústula (3er. día), se transformó en vesícula y se ulceró (décimo día), dejó una lesión ulceronecrotica negruzca de 0.5 cm de diámetro poco dolorosa, con eritema y edema perilesional. Fiebre de 38°C, astenia y adinamia.



Figura 4. El exudado tomado de la lesión cutánea se sembró en agar gelosa sangre de borrego a 37°C. A las 10 horas se observó la presencia de colonias blanquecinas secas y muy adherentes al medio de cultivo. Esta bacteria no es fastidiosa, en agar sangre de conejo forma colonias ligeramente hemolíticas que tienen forma de "cabeza de medusa".



Figura 5. Colonias observadas con el microscopio estereoscópico. Se demuestra el borde de la colonia riziforme y ondulado x 10.



Figura 6. En un frotis delgado de la colonia teñido con el método de Gram se observan abundantes bacilos largos y cortos teñidos de color azul púrpura (gram positivo). Esta morfología es característica de la fase vegetativa y toxigénica del *B. anthracis*. Frotis del cultivo a las 8 horas x 600.



Figura 7. En un frotis del cultivo observado a las 48 horas se ven los bacilos con los extremos cuadrados, miden de 1 a 1.3 micrones de ancho y de 3 a 10 micrones de largo. En el interior del cuerpo bacilar se aprecia la existencia de esporas centrales y ovoides (sin teñir) que no rebasan la superficie externa de la bacteria. Incubación aeróbica a 20°C. Tinción de Gram x 1,000.

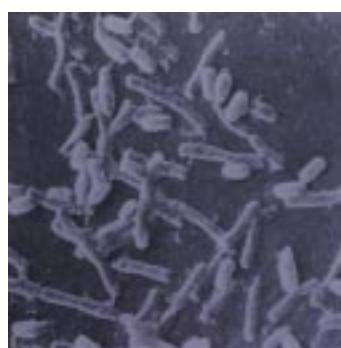


Figura 8. Con la microscopía de barrido se puede observar la morfología característica del *B. anthracis* "en caña de bambú chino" las esporas son más cortas y más electrodensas y de forma ovoide. Estas esporas son formas resistentes del germen y pueden permanecer viables en los cadáveres y en la tierra por décadas; suelen resistir la resequedad, el calor, la luz ultravioleta, la radiación gamma de onda corta y muchos desinfectantes químicos, por esta razón se han usado como armas biológicas poderosas x 5,000.



Figura 9. Microscopia de barrido. La espora bacteriana de frente, incubada en medio de suero humano fresco a 37°C, emerge una célula vegetativa, el proceso de germinación se realiza dentro de los macrófagos humanos. La célula vegetativa se reproduce en la sangre y genera la toxemia característica del ántrax septicémico x 50,000.

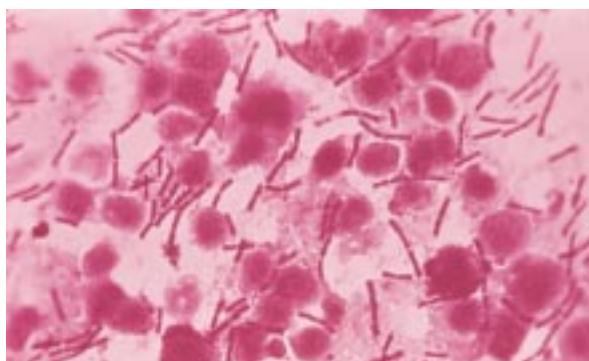


Figura 10. Frotis obtenido de una microvesícula en un caso de carbunco cutáneo. Se observan células vegetativas abundantes rodeadas de una cápsula externa, en estas lesiones clínicamente "activas" no hay esporas. Tinción de Gram x 500. La cápsula es un polímero del ácido D. glutámico de alto peso molecular y es un factor de virulencia bacteriana.

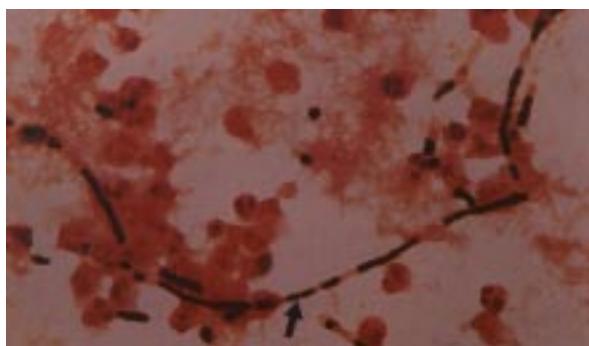


Figura 11. Frotis del líquido cefalorraquídeo (LCR) de un paciente con meningoencefalitis y septicemia causadas por *B. anthracis*, la pequeña lesión primaria se localizó en la región cervical del paciente. Obsérvese la presencia de filamentos bacilares largos "en cadena", macrófagos, polimorfonucleares, neutrófilos y eritrocitos. El ántrax produce necrosis hemorrágica del tejido cerebral afectado y el laboratorista puede observar la bacteria en el LCR y cultivarla en gelosa sangre de borrego.

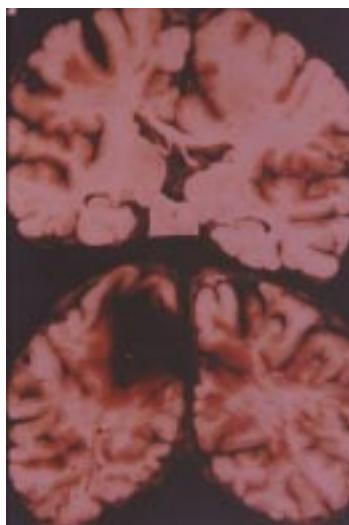


Figura 12. Estudio post mortem. En el corte macroscópico del encéfalo se observó las meninges congestionadas y la presencia de necrosis hemorrágica del hemisferio derecho. El ántrax sistémico produce bacteremia y con frecuencia invade y lesiona las meninges y el tejido cerebral. El método microbiológico de confirmación más útil es el hemocultivo y puede obtenerse crecimiento bacteriano a las 6-24 horas.



145

Figura 13. Estudio histopatológico del tejido cerebral del caso de la figura 12. El patólogo practicó cortes histológicos seriados, habiéndose demostrado la presencia de grandes cantidades de bacilos en la zona necrótica del encéfalo. *B. anthracis* es un germen peligroso para el personal de laboratorio, se recomienda extremar las medidas de seguridad y cultivar las muestras con guantes y cubrebocas, bajo una campana microbiológica de máxima seguridad. Tinción de Brow-Bren x 600.



Figura 14. *Bacillus anthracis* produce una exotoxina edemágena (enzima adenilatociclasa dependiente de la calmodulina), como se demuestra en este paciente quien presentó hinchazón intensa del párpado izquierdo con amoratamiento y necrosis hemorrágica.

tinales, bazo, exudado pleural peritoneal, líquido cefalorraquídeo y encéfalo, que pueden ser cultivadas o fijadas en formaldehído al 10% para examen histopatológico.⁷⁻⁹

Frotis delgados para microscopia

Se debe preparar dos frotis delgados del líquido vesicular, sangre o LCR al llegar las muestras al laboratorio; se pueden fijar en líquido de Zenker (la fórmula es bicromato de potasio acuoso 2.5% y cloruro de mercurio 8%) por 3 a 5 minutos o bien formaldehído acuoso al 37% por 10 minutos para garantizar la inactivación de las esporas. Uno de los frotis se tiñe con el método de Gram y el otro se examina con la técnica de anticuerpos fluorescentes.^{10,11}

Patogenia del ántrax

146

La infección comienza con la introducción de las esporas al huésped y su ingestión por los macrófagos. Dentro de los fagocitos las esporas germinan y se generan los bacilos de la fase vegetativa que se reproducen localmente y cuando la bacteria invade el torrente sanguíneo las exotoxinas sintetizadas producen los síntomas y signos de la enfermedad. Experimentalmente se ha demostrado que al inyectar el suero neutralizante obtenido de animales previamente infectados se puede modificar el curso de la enfermedad; de este modo se comprobó la virulencia del *B. anthracis* y sus exotoxinas.¹²⁻¹⁷ La investigación realizada en los últimos 50 años referente a los componentes de las exotoxinas y su mecanismo de acción ha ayudado a entender los hallazgos patológicos encontrados en las víctimas del ántrax. Se conoce la existencia de tres factores de virulencia presentes en las cepas de *B. anthracis* causantes de enfermedad: 1) la cápsula de ácido glutámico antifagocítica, 2) la toxina letal necrotizante y hemorragípara y 3) la toxina causante del edema.

Se ha descrito otro componente conocido como "antígeno protector" el cual se une al factor letal

para producir la toxina letal; del mismo modo se liga con el factor edema para generar la toxina edematógena; esta unión se realiza en la membrana celular del hospedero, es decir, este "antígeno protector" facilita la entrada de ambos factores de virulencia al interior (citosol) de la célula animal y de esta manera se adquieren las actividades biológicas de citotoxicidad e histonecrosis (figura 1).

Las bacterias mutantes que no forman cápsulas son menos virulentas. Se han reconocido dos plasmidos responsables de sintetizar la cápsula y la exotoxina del ántrax.^{7,12,15} La producción de los componentes tóxicos es favorecida en el ambiente interno del hospedero, cálido y rico en bicarbonato.¹⁸ El polímero capsular de ácido glutámico es necesario para inhibir la ingestión de la bacteria por los fagocitos, aunque la exotoxina tiene también un efecto antifagocítico y simultáneamente bloquea la cadena oxidativa de los macrófagos que contienen al *B. anthracis*.¹⁹ La toxina edematógena incrementa los niveles intracelulares de adenosinmonofosfato cíclico (cAMP) y se induce así el edema lesional y la compresión tisular asociados a la proliferación bacteriana.

Como su nombre lo indica, la toxina letal parecería ser el factor de virulencia bacteriana más importante, este componente tóxico es citolítico para los macrófagos y secundariamente induce la liberación del factor de necrosis tumoral alfa (FNT-alfa) y de la interleucina (IL-1) productos que contribuyen a incrementar la citoletalidad. Los anticuerpos específicos contra el FNT-alfa y la IL-1, inyectados a los ratones infectados, suelen proteger al animal contra el efecto de una dosis letal de la exotoxina del ántrax, por tanto, la destrucción del macrófago es un mecanismo crítico en la patogenia de la toxina letal. En otro experimento se demostró que los ratoncillos de laboratorio depletados de macrófagos son resistentes al efecto letal de la toxina con supervivencia de 100%, contra sólo 10% registrado en el grupo control, pero la reinyección de los macrófagos aunque no de otros tipos celulares, restauró la letalidad de la

toxina bacteriana.^{15,20-25} En las figuras 1 y 2 se resume la patogenia y fisiopatología del ántrax.

Referencias

1. Inglesby TB, Henderson DA, Barlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Friedlander AM et al. Anthrax as a biological weapon. Medical and public health management. *JAMA* 1999; 281: 1735-1745.
2. Centers for diseases control and prevention, bioterrorism alleging use of anthrax and interim guidelines for management. United States 1998, MMWR. *Morb Mortal Wkly Rep* 1999; 48: 69-74.
3. Williams RP. *Bacillus anthracis* and other spore forming bacilli. In: Braude AI, Davis LE, Fierer J (eds). *Infectious diseases and medical microbiology*. Philadelphia: Saunders, 1986: 270.
4. Thorne CB. *Bacillus anthracis*. In: Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R (eds). *Bacillus subtilis and other gram positive bacteria. Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics*. Washington DC: Amer Society for Microbiology, 1993: 113-124.
5. Gold E. Treatment of anthrax. *Fed Proc* 1967; 26: 1563-1568.
6. Novel E, Pongrants E. The survival of spores of *B. anthracis* and two other bacterial species. *Pathol Microbiol* 1969; 33: 180-184.
7. Friedlander AM. Anthrax. In: Sidell FR, Takafuji ET, Franz DR (eds). *Medical aspects of chemical and biological warfare*. Washington DC: Office of the Surgeon General, US Army, 1997: 467-478.
8. Turnbull PCB, Kramer JM. *Bacillus*. In: Ballows A (ed). *Manual of clinical microbiol*. 5th ed. Washington, DC: Amer Society for Microbiology, 1991: 296-303.
9. Parry JM, Turnbull PCB, Gibson JR. *A color atlas of Bacillus species*. London: Wolfe Medical, 1983: 272-279.
10. Marty AM. (ed). *Laboratory aspects of biowarfare*. Clin Lab Med. Philadelphia: Saunders Co 2001; 21(3): 411-691.
11. Turnbull PCB. Definite identification of *Bacillus anthracis*. A review. *J Appl Microbiol* 1999; 87: 237-240.
12. Dixon TC, Meselson M, Guillemin J, Hanna PC. Anthrax. Medical Progress. *N Engl J Med* 1999; 341(11): 815-826.
13. Thorne CB. Genetics of *Bacillus anthracis*. In: Lieve L (ed). *Microbiology*. Washington, DC: Amer Society for Microbiol, 1985: 56-62.
14. Ezzell J, Abshire TG, Little SF. Identification of *Bacillus anthracis* by using monoclonal antibody to cell wall galactose-N-acetylglucosamine polysaccharide. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2-23.
15. Farrar WE. Anthrax: virulence and vaccines. *Ann Intern Med* 1994; 121: 379-380.
16. Laforce FM. Anthrax. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 1009-1014.
17. Amith H, Keppie J. Observations on experimental anthrax: demonstration of a specific lethal factor produced *in vivo* by *Bacillus anthracis*. *Nature* 1954; 173: 869-870.
18. Sirard JC, Mock M, Fouquet A. The three *Bacillus anthracis* toxin genes are coordinately regulated by bicarbonate and temperature. *J Bacteriol* 1994; 176: 5188-5192.
19. O'Brien J, Friedlander A, Dreier T. Effects of anthrax toxin components on human neutrophils. *Infect Immun* 1985; 47: 306-310.
20. Bhatnagar R, Singh, Leppla SH. Calcium is required for the expression of anthrax lethal toxin activity in the macrophagelike cell line J 774.1. *Infect Immunol* 1989; 57: 2107-2114.
21. Friedlander AM. Macrophages are sensitive to anthrax lethal toxin through an acid-dependent process. *Biol Chem* 1986; 261: 7123-7126.
22. Carrada-Bravo T. Ántrax: diagnóstico, patogenia, prevención y tratamientos. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2001; 14(4): 233-248.
23. Brachman PS. Anthrax. In: Hoeprich PD, Jordan MC, Ronald AR (eds.). *Infectious diseases*. 5th ed, Philadelphia: Lippincott, 1994: 1003-1008.
24. Harrison LH, Ezzell JW, Abshire TG. Evaluation of serologic tests for diagnosis of anthrax after an outbreak of cutaneous anthrax in Paraguay. *J Infect Dis* 1989; 160: 706-710.
25. Franz DR, Jahrling PB, Friedlander AM. Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. *JAMA* 1997; 278: 399-411.