

Clase teórica

Géneros de bacterias que no toman la coloración de Gram (I)

Parte 1: *Mycobacterium*

Parte 2: *Treponema* y *Leptospira*

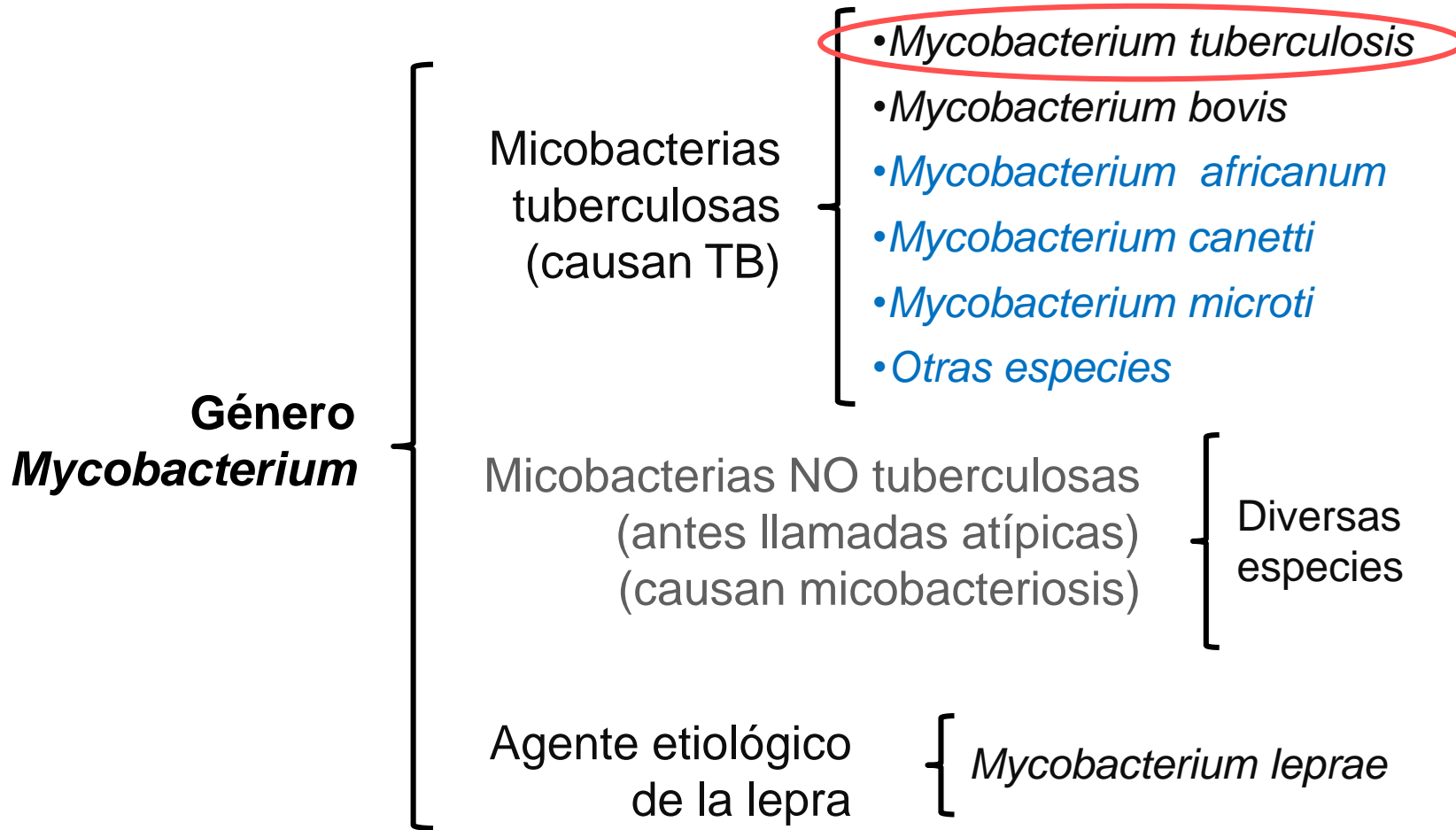


Dr. Daniel O. Sordelli
Profesor Titular

Asignatura: Microbiología y Parasitología I
PRIMERA CATEDRA

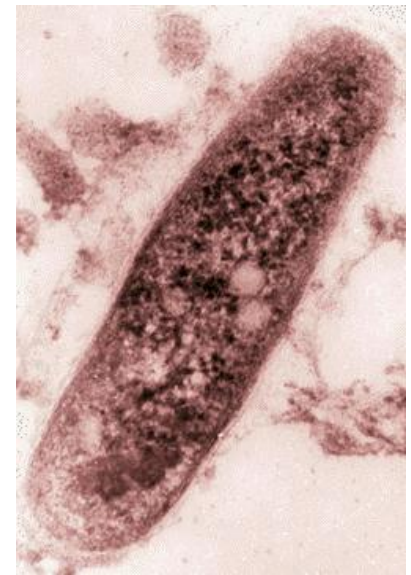
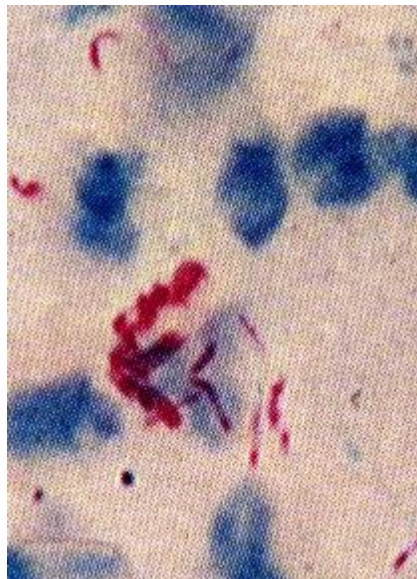
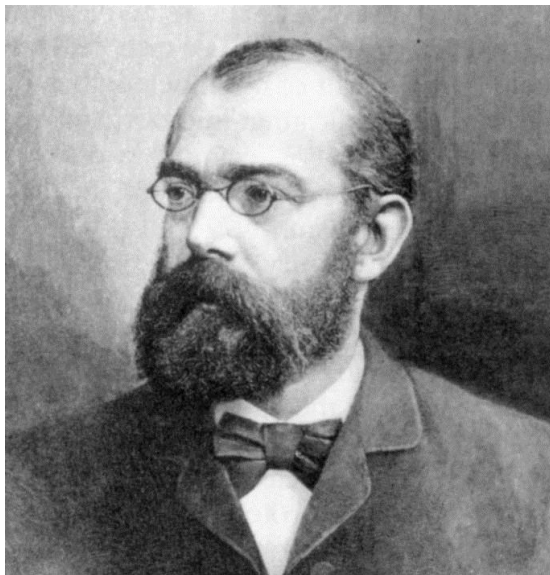
Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología

TB: agentes etiológicos



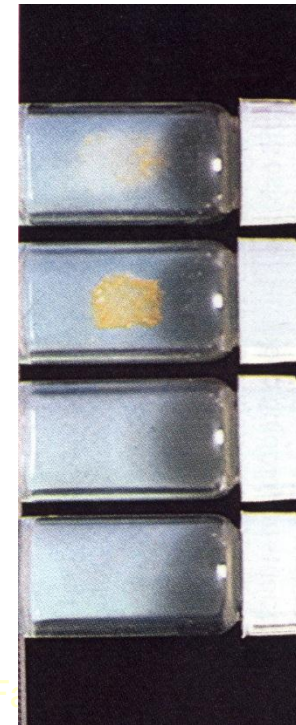
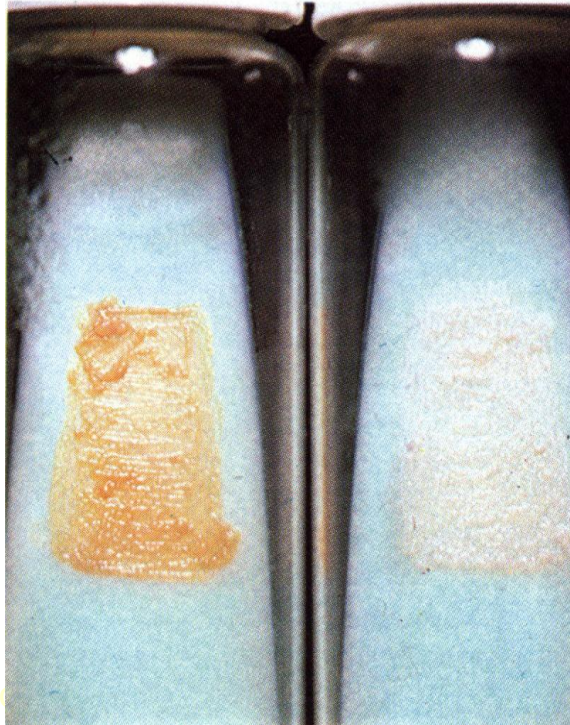
***Mycobacterium*: morfología y tinción**

- Más de 130 especies
- *M. tuberculosis* descubierto por Robert Koch en 1882
- Bacilos inmóviles, delgados, rectos o ligeramente curvos
- No presentan cápsula ni esporas
- Envolturas contienen alta proporción de lípidos (60% en peso)
- Bacilo ácido-alcohol resistentes (tinción de Ziehl-Neelsen) (BAAR)



M. tuberculosis: cultivo in vitro

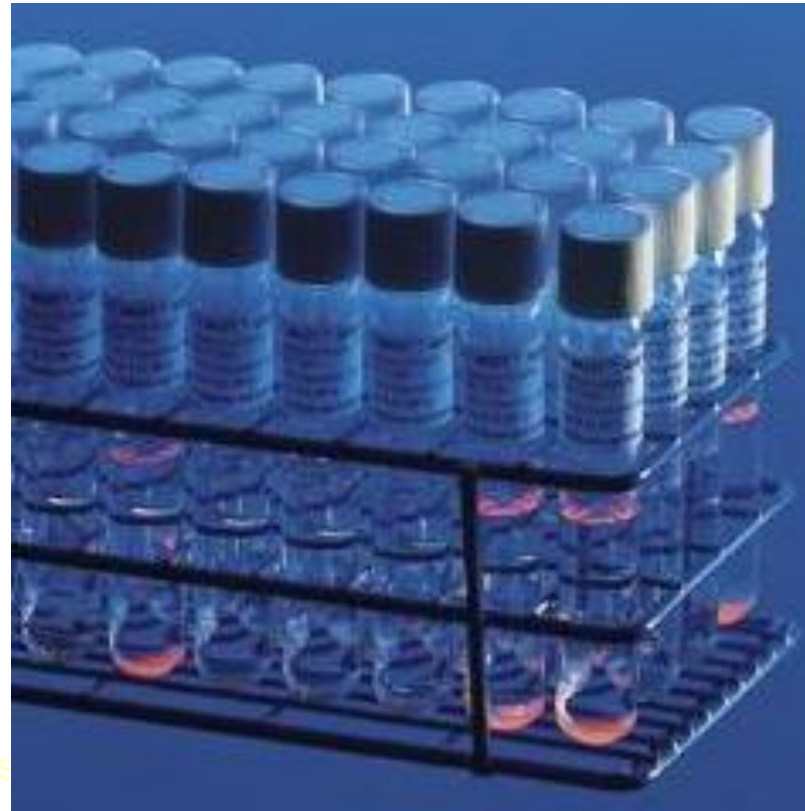
- ✓ Aerobios estrictos de crecimiento lento (tiempo medio de generación: 12 a 24 horas).
- ✓ Micobacterias patógenas crecen mejor a 37°C.
- ✓ Medios: Lowenstein-Jensen (glicerol, almidón de papa, huevo coagulado, asparagina, verde de malaquita, sales), Stonebrink (huevo, piruvato, sales).
- ✓ Identificación de especie por pruebas bioquímicas (niacina, ureasa, reducción de nitratos, etc.).



TB: diagnóstico microbiológico

Método fluorométrico: BACTEC MGIT 960

Principio: detección de fluorescencia que emite un fluorocromo sensible al O_2 . Inicialmente el O_2 disuelto en el medio de cultivo extingue la emisión de fluorescencia. A medida que la micobacteria consume O_2 , se suprime la extinción (quenching) de la fluorescencia, que así puede ser detectada.



TB: diagnóstico microbiológico

Método de amplificación (Xpert MTB/RIF)

Principio: amplificación por “Real-Time” PCR de secuencias específicas de ADN de *M. tuberculosis* y del gen que codifica la resistencia a la rifampicina. Permite la obtención de resultados en 120 minutos a partir de una muestra de esputo.

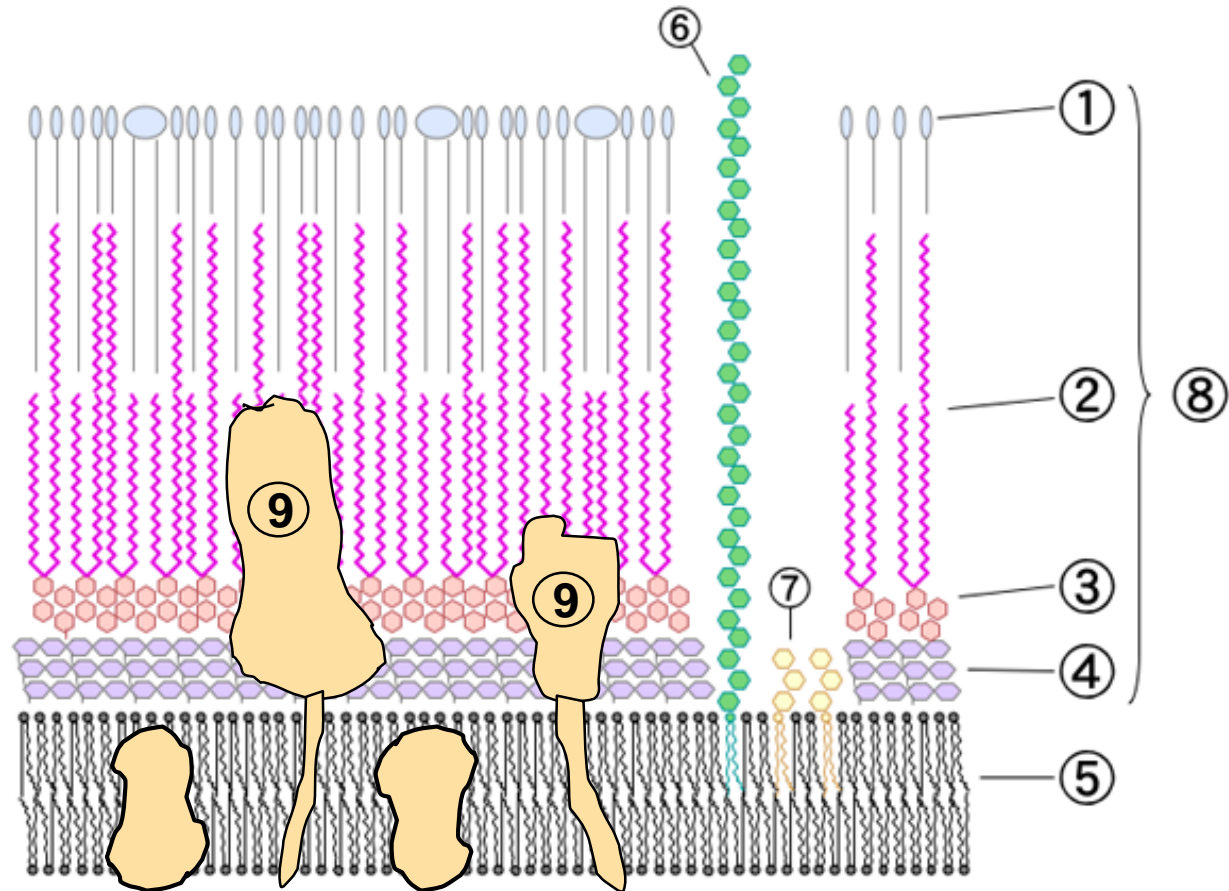
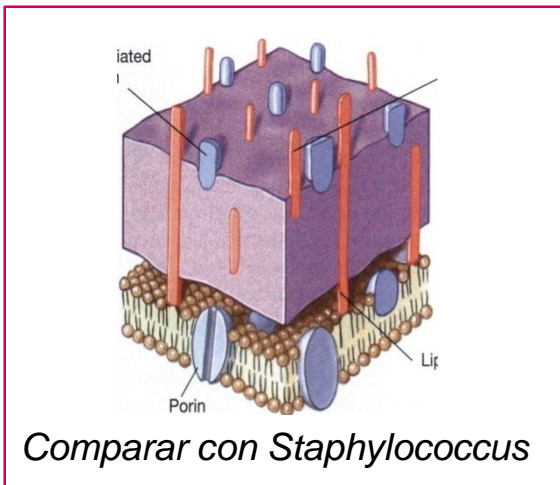


***Mycobacterium*: resistencia a agentes físicos**

- Resisten ácidos, álcalis y a la mayoría de los desinfectantes.
- Inactivados por formaldehído, glutaraldehído, fenol, etanol al 70% y parcialmente por hipocloritos
- Resisten la desecación
- Son sensibles a la luz solar

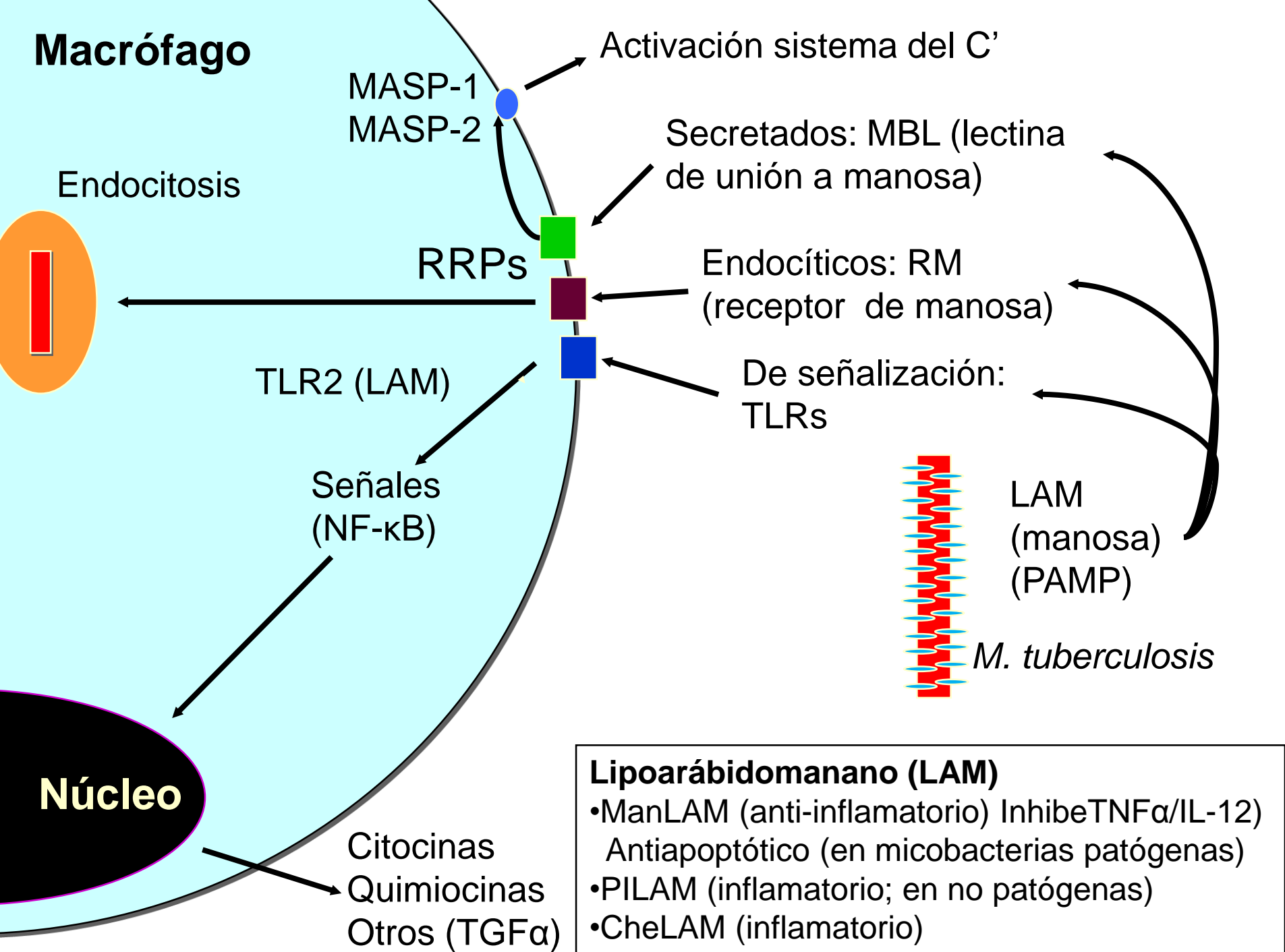
***Mycobacterium*: envolturas**

- Estructura de la pared que asemejaría a la de los Gram (+)
- Pared celular con alto contenido lipídico (60% de su peso seco)
- Contenido proteico de la pared aprox. 15% (dan origen al PPD de *M. tuberculosis*)

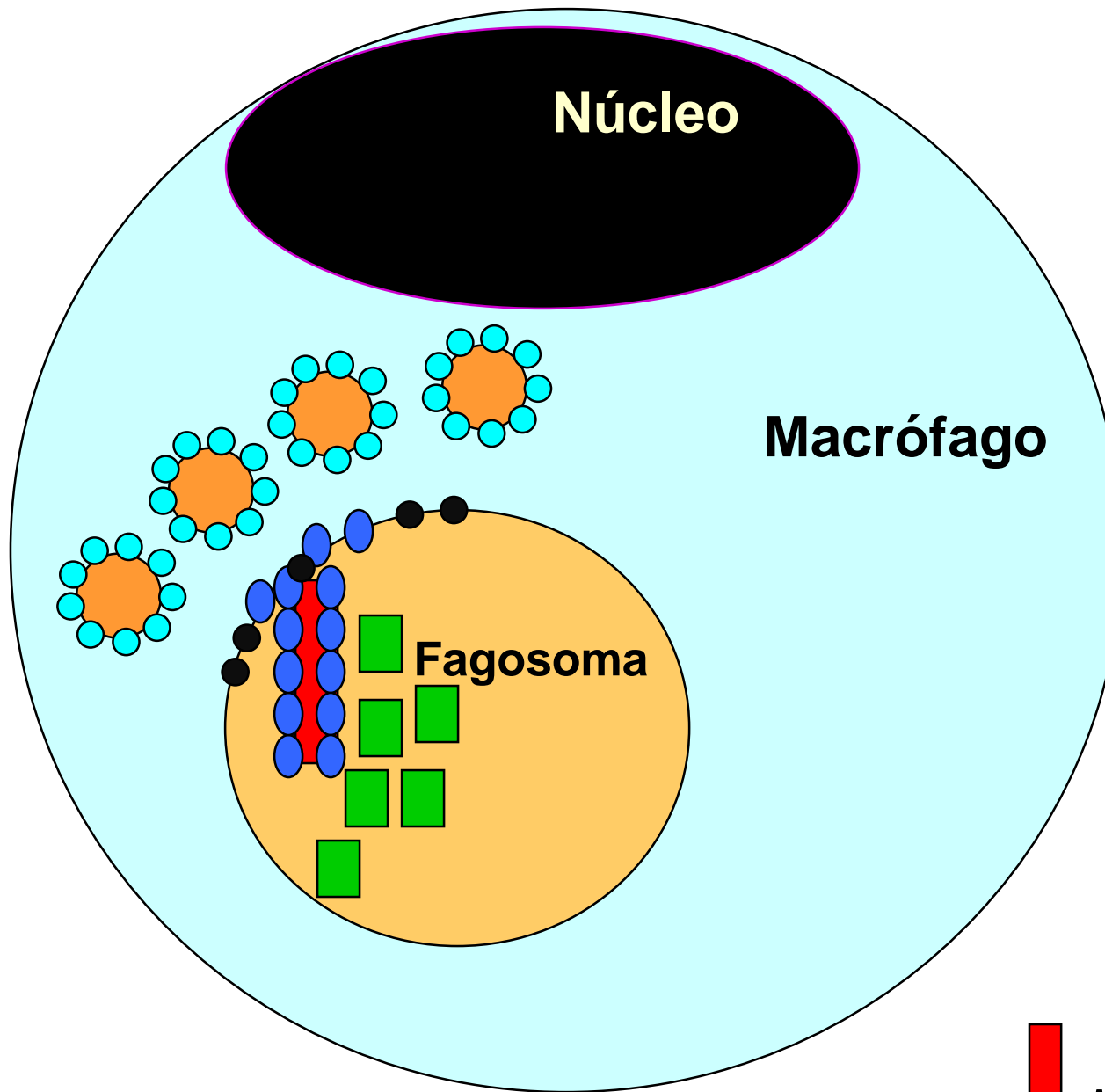


Mycobacterium

- 1) Lípidos exteriores
- 2) Ácido micólico
- 3) Arabinogalactano
- 4) Peptidoglicano
- 5) Membrana citoplásmica
- 6) Lipoarabinomano (LAM)
- 7) Fosfatidilinositol-manósido
- 8) Esqueleto de la pared celular
- 9) Proteínas de la pared



***Mycobacterium:*
eventos intracelulares**



■ Amoníaco (NH_3)
producido por acción de
ureasa, arginasa,
glutaminasa y
asparaginasa

● Lisosomas
(● EEA1: Ag
endosomal
específico)

● PI-3-P

● Sulfátidos y
factor cuerda

M. tuberculosis

***M. tuberculosis*: otros factores de virulencia y patogénesis**

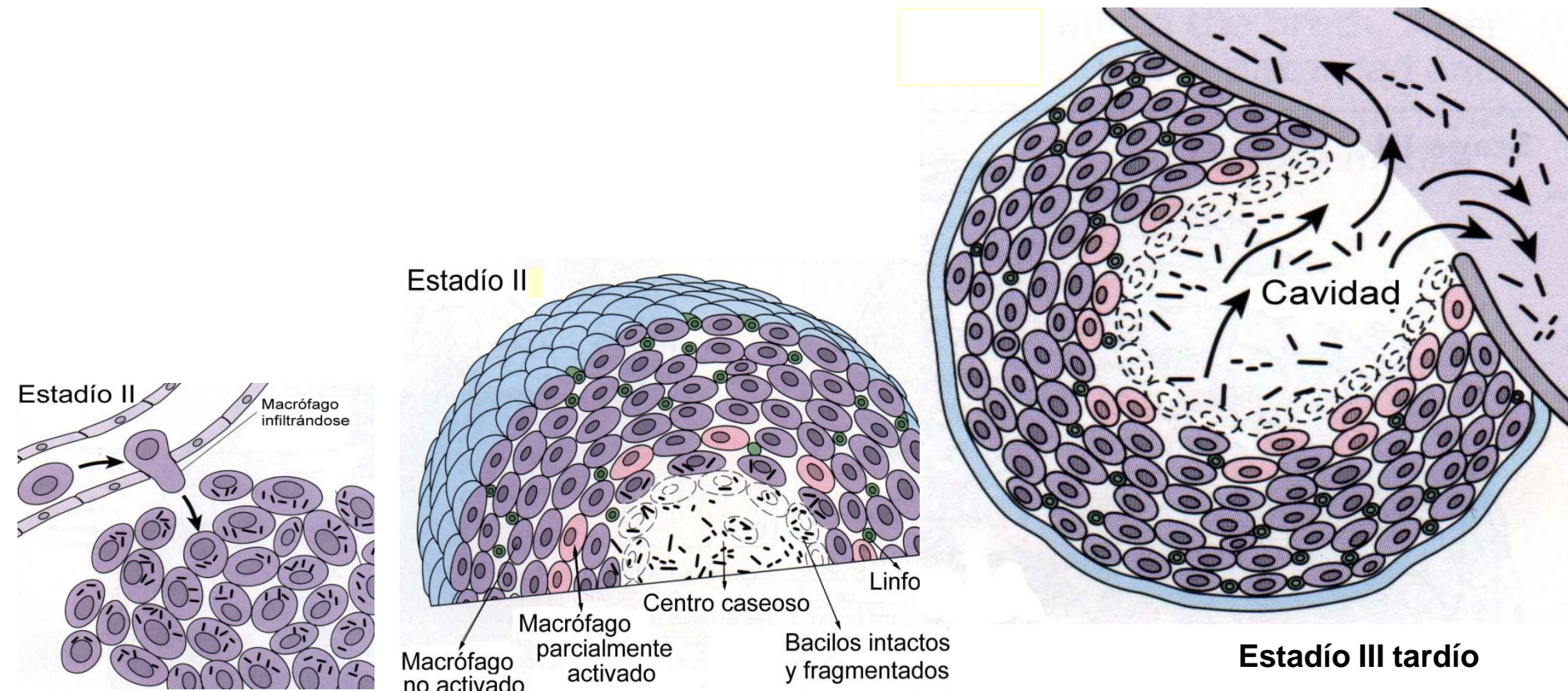
- Factor cuerda (dimicolato de 6,6'-trehalosa)
 - Presente en micobacterias patógenas
 - Intensa actividad proinflamatoria
- Las micobacterias no producen exotoxinas



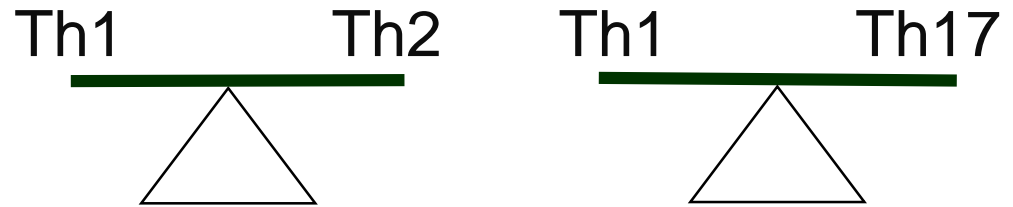
***M. tuberculosis*: enfermedad de larga evolución**

- **Evasión**

- El huésped se daña a si mismo
- Respuesta inmune adaptativa contra antígenos micobacterianos
- Hipersensibilidad del tipo IV (retardada)

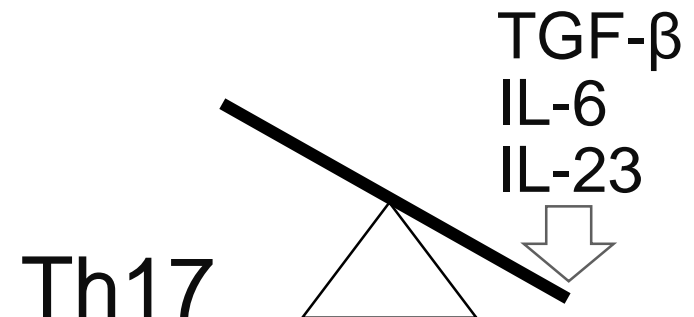
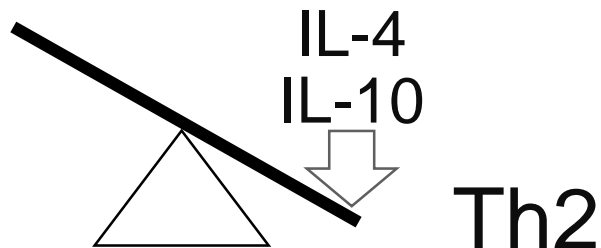
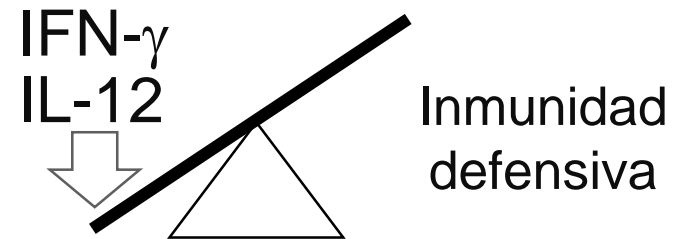


Equilibrios inmunes en la tuberculosis



Factores que alteran el equilibrio:

- Cantidad de antígeno
- Virulencia de la cepa bacteriana
- Estado inmunitario del huésped (enfermedades de base)
- Otros



Estimulación continua de la reacción inmune: hipersensibilidad

Micobacterias tuberculosas y tuberculosis (TB)

- ***Mycobacterium tuberculosis***

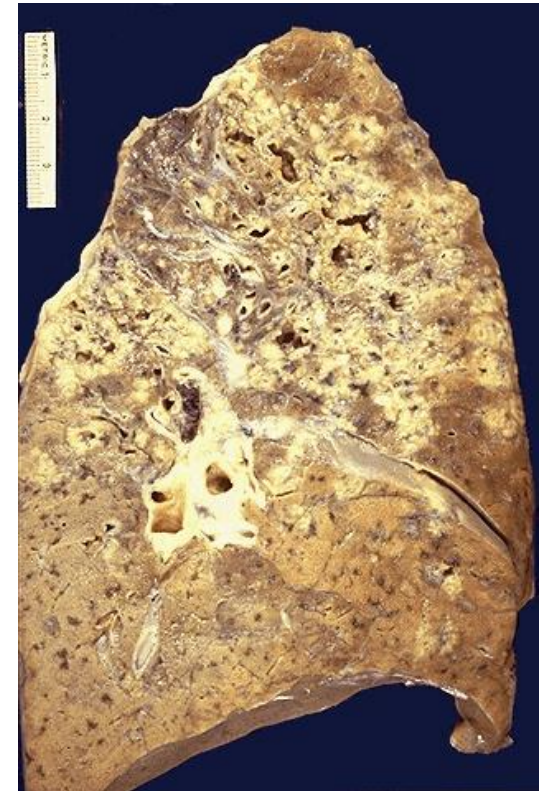
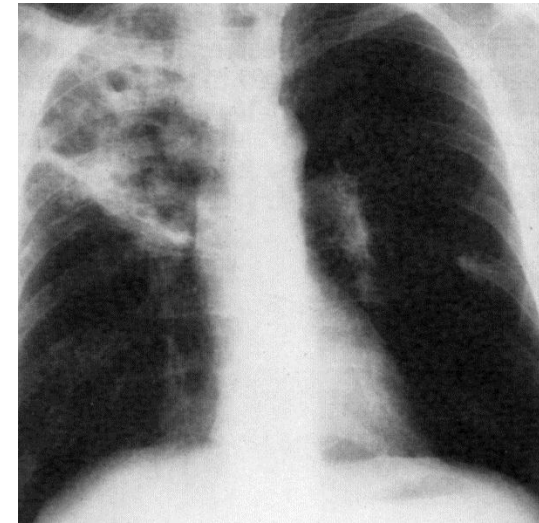
- ***Mycobacterium bovis***

- ***Mycobacterium africanum***

- *Mycobacterium canetti*

- *Mycobacterium microti*

- Enfermedad crónica, ampliamente diseminada
- Incidencia anual mundial: 8-12 millones
- Prevalencia mundial: 20 millones
- Muertes por TB: 3 millones al año
- De 1.500 a 2.300 millones de infectados
- Argentina: 12.000 a 14.000 nuevos casos al año
- 50% de los casos en área metropolitana Bs. As.
- Co-infección con VIH. Hacinamiento
- *M. bovis*: <1% de los casos de TB pulmonar
- Transmisión aerógena (la más frecuente)
- Muy baja dosis infectante (aprox. 10 bacterias)



Micobacterias no tuberculosas

- Causan micobacteriosis (muy frecuentemente pulmonares)
- Estructura similar a la de *M. tuberculosis*
- Diferenciables por velocidad de crecimiento y pigmentación (antigua clasificación de Runyon)

➤ **Crecimiento lento:**

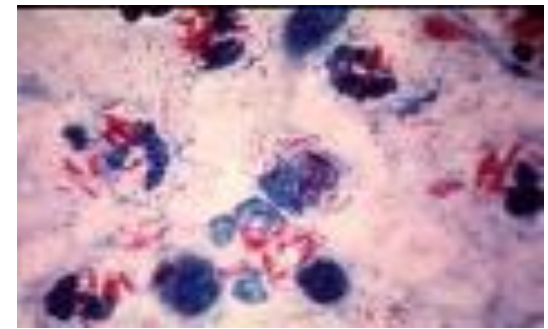
- Acromógenas (no pigmentadas): *avium-intracellulare*, *terrae*, etc.
- Pigmentadas: Fotocromógenas (por exposición a la luz)
(*marinum*, *simiae*, etc.)
Escotocromógenas (en ausencia de luz)
(*scrofulaceum*, *xenopi*, etc.)

➤ **Crecimiento rápido** (*fortuitum*, *chelonae*, etc) (siempre mucho más lento que la mayoría de las bacterias)

- Menos virulentas que *M. tuberculosis*
- Oportunistas
- Coinfección con HIV

***Mycobacterium leprae* y lepra (Enfermedad de Hansen)**

- Bacilo alcohol-ácido resistente
- ***M. leprae* no crece en medios de cultivo**
- Infección crónica de la piel y mucosas
- Largo período de incubación. hasta 30 años (promedio 5-7 años)
- Area endémica: Chaco, Santa Fe, Formosa, Buenos Aires, Corrientes, Entre Ríos, Misiones.
- Incidencia: de 400 a 500 nuevos casos por año
- Prevalencia: entre 1,5 a 2 por cada 1.000 habitantes en el área endémica
- Manifestaciones clínicas: varían ampliamente entre dos formas polares lepra lepromatosa y lepra tuberculoide.
- Espectro clínico refleja el grado de IMC a *M. leprae*



Géneros de bacterias que no
toman la coloración de Gram:

PARTE II: *Treponema* y *Leptospira*

Bacterias con morfología espiralada

- Géneros con importancia médica:
 - *Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira*
- Especies con importancia médica en Argentina:
 - *Treponema pallidum* subesp. *pallidum* (sífilis)
 - *Leptospira interrogans* (leptospirosis)
- Otras con importancia médica (fuera de Argentina):
 - *Treponema pallidum* subesp. *endemicum* (bejel)
 - *Treponema pallidum* subesp. *pertenue* (pian)
 - *Treponema carateum* (pinta)
 - *Borrelia recurrentis* y otras spp. (fiebre recurrente)
 - *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme) (?)

Treponema

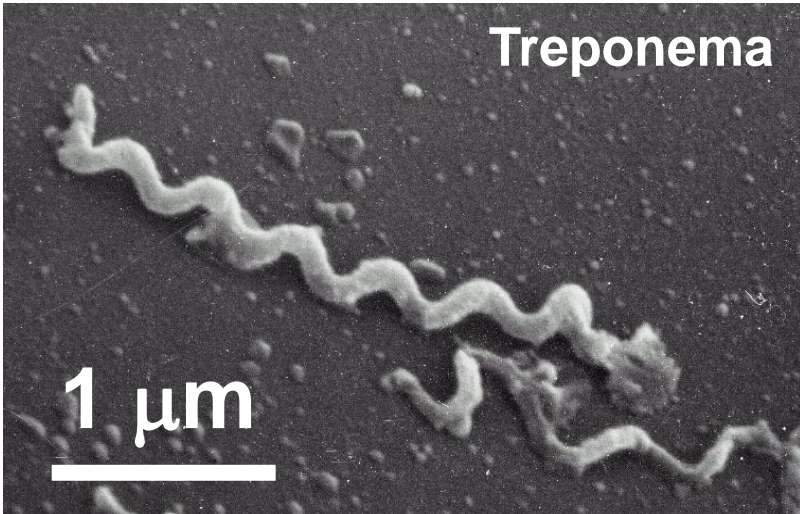
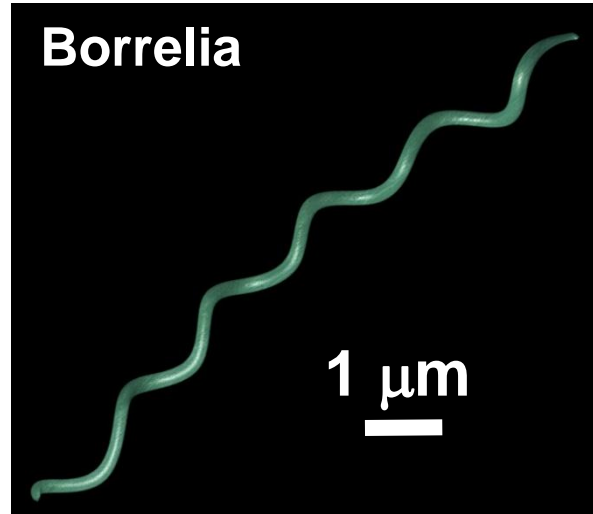
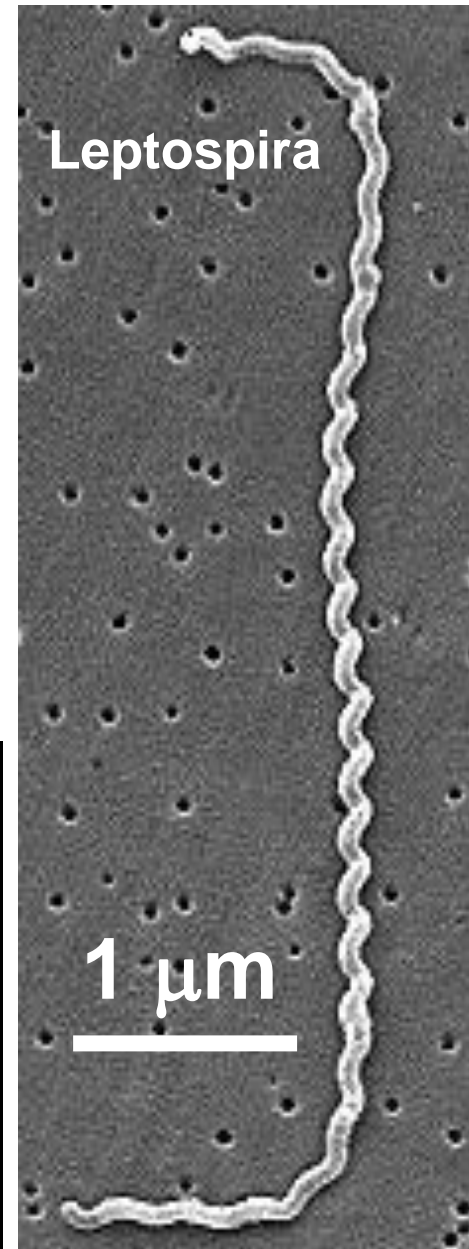
1 μm

Borrelia

1 μm

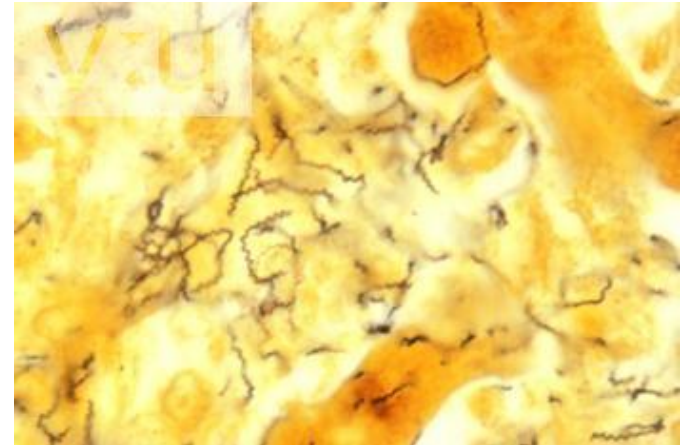
Leptospira

1 μm

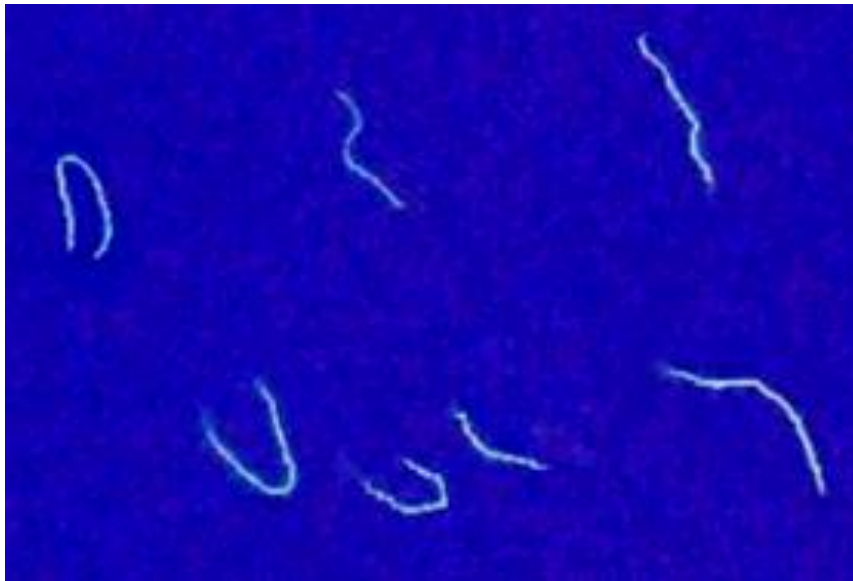


Bacterias del género *Treponema*

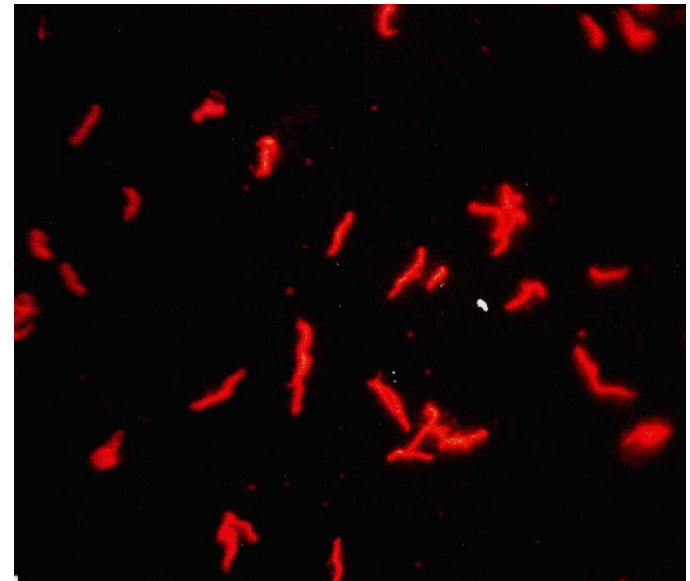
- Muy finas (ϕ sección 0,1-0,2 μm)
- No visibles por tinción de Gram
- Móviles
- Aerobias estrictas
- Tiempo medio de generación: aprox. 30-33 horas
- **No pueden cultivarse in vitro**
- Propagación: testículo de conejo



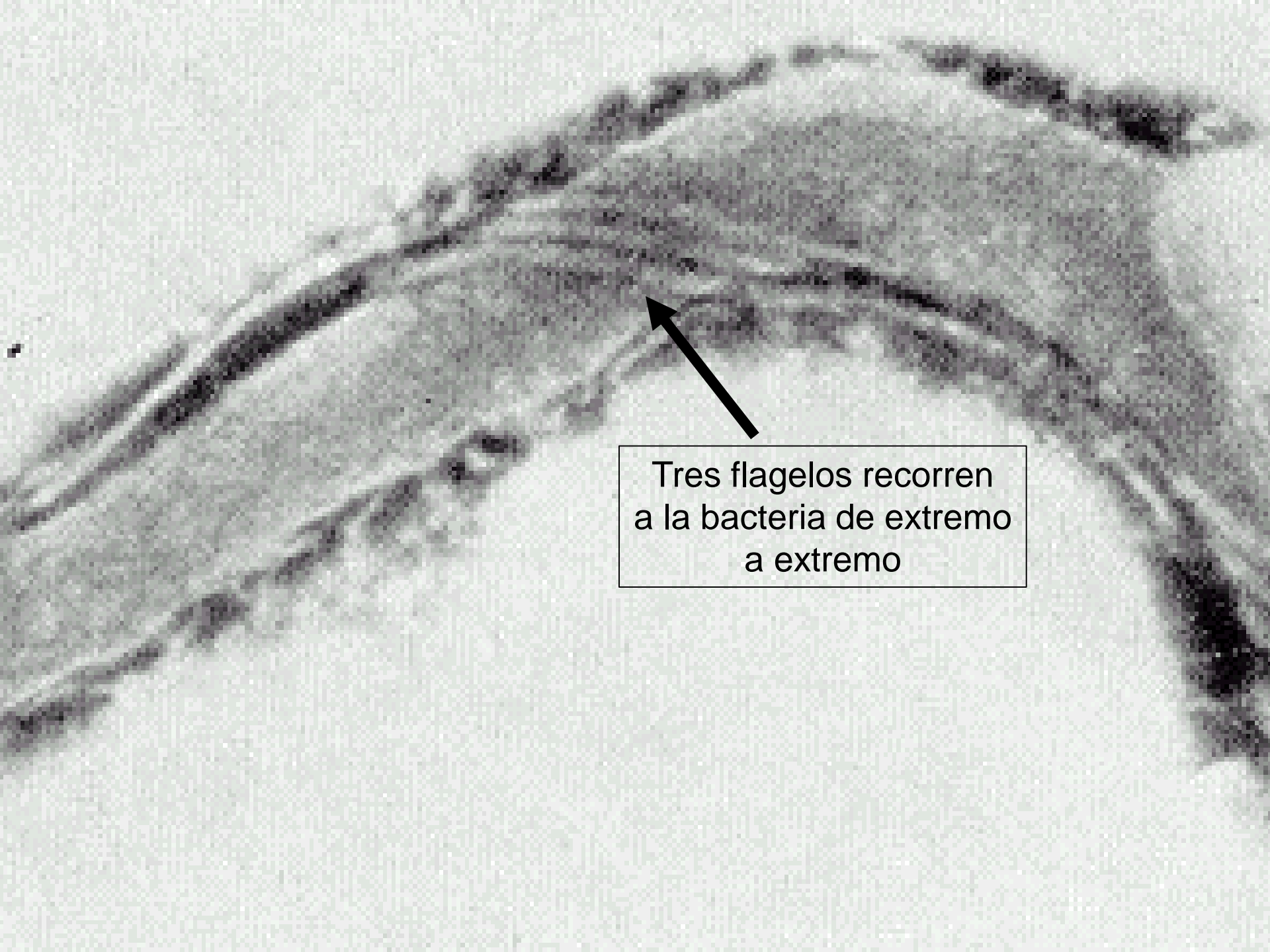
Impregnación argéntica



Contraste de fase

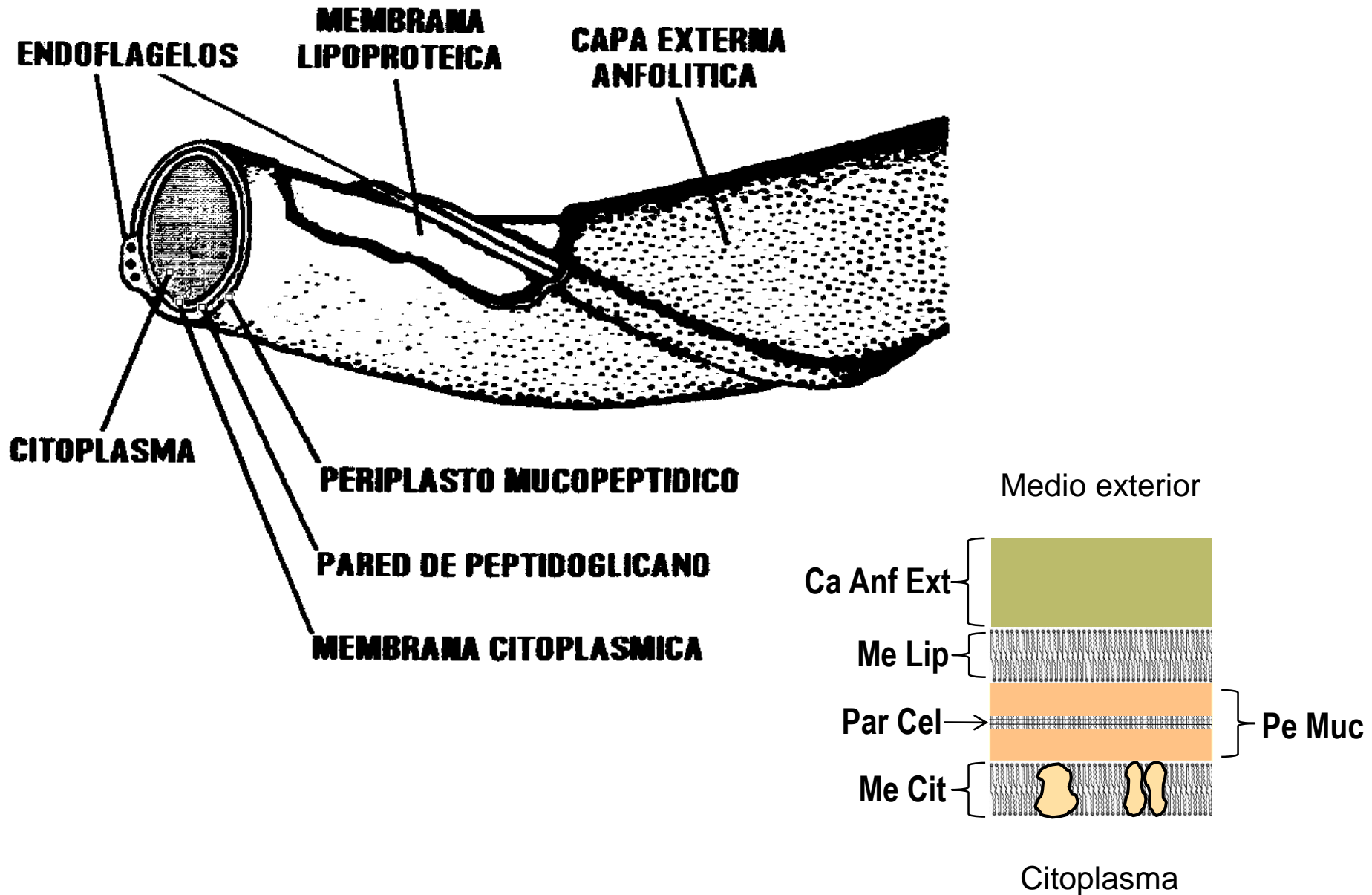


Inmunofluorescencia

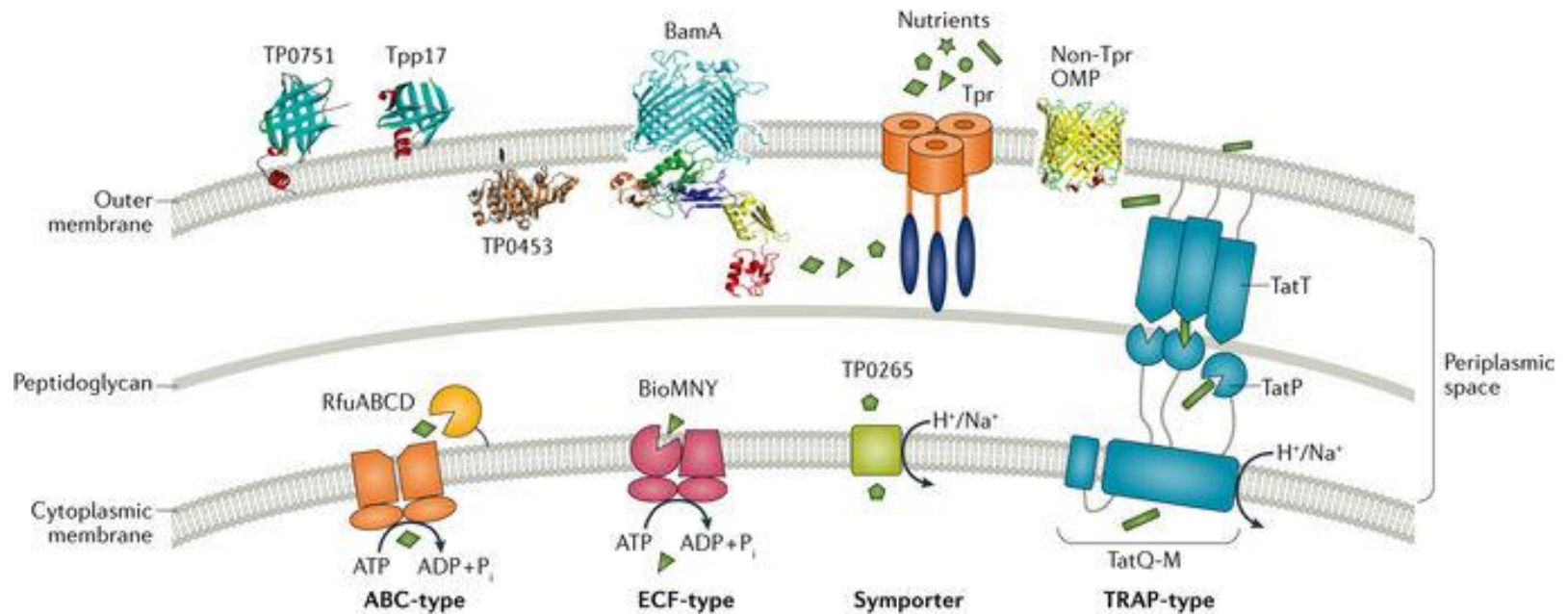


Tres flagelos recorren
a la bacteria de extremo
a extremo

T. pallidum: esquema de sus envolturas



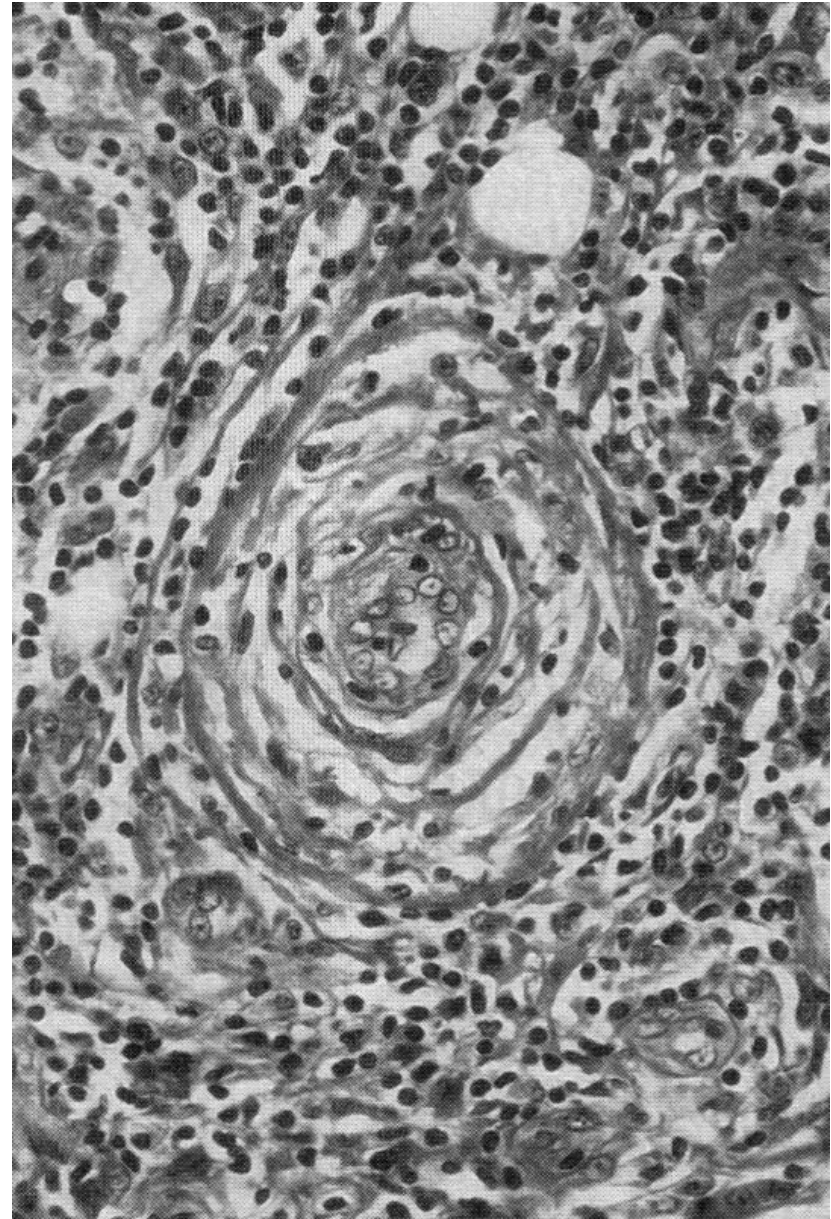
T. pallidum: contenido proteico



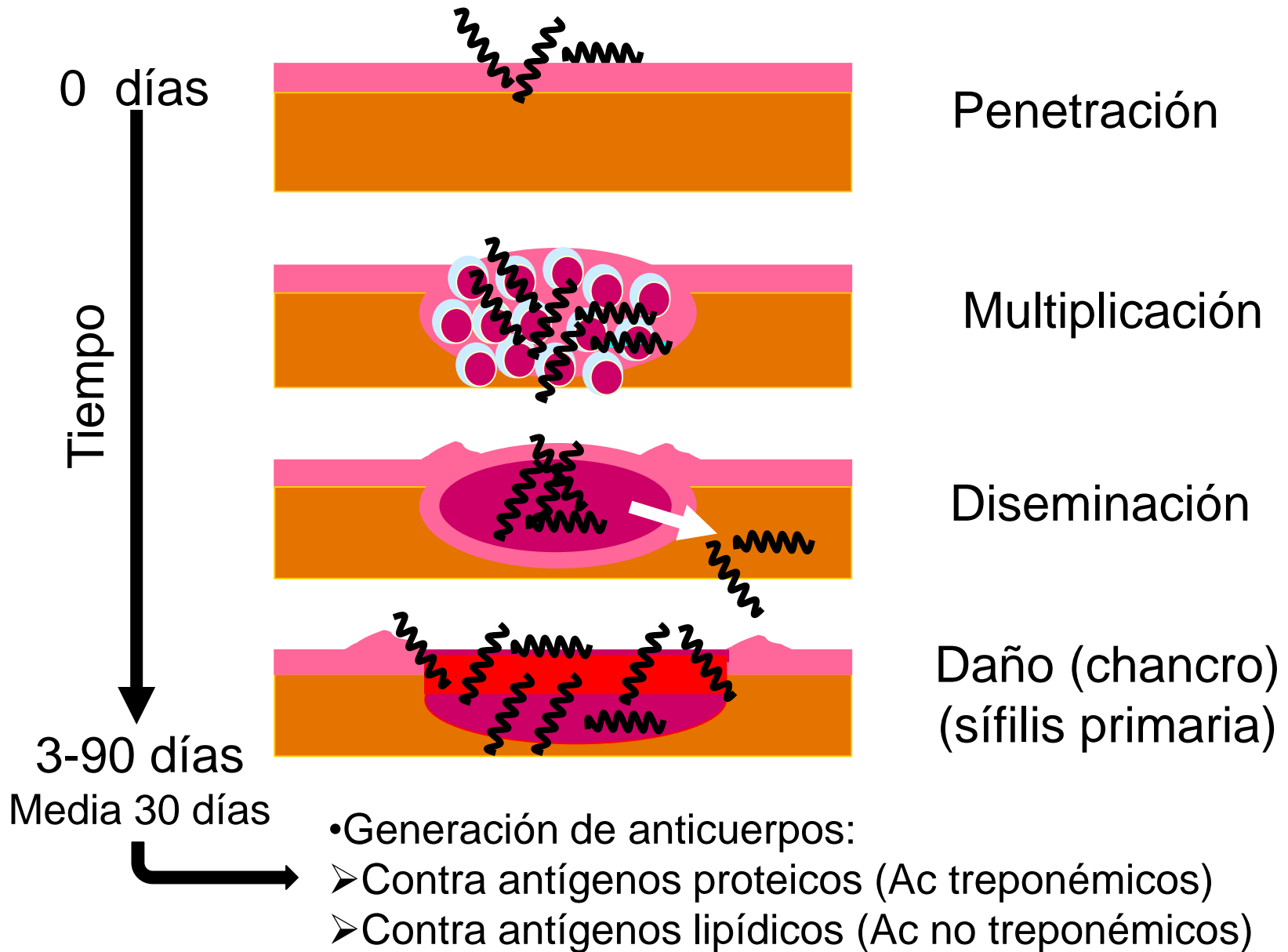
- Muchas proteínas sumergidas en el espacio periplásmico (no actúan como PAMPs): evasión de la inmunidad innata.
- Muy pocas lipoproteínas con exposición al exterior:
TP0751 (palilisina: adherencia a laminina y degradación de coágulos); TP0155 y TP0483 (adherencia a fibronectina).
- Diversas proteínas hacen variación antigénica, otras están en un muy baja cantidad.

Virulencia de *Treponema pallidum*

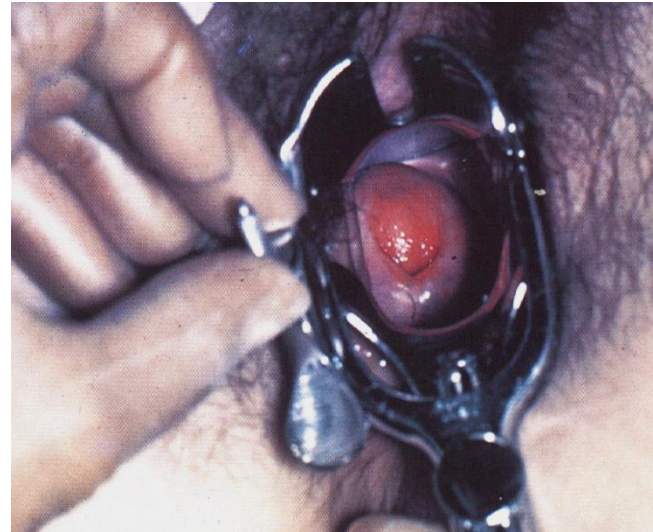
- Alta motilidad
- Símil-lipopolisacárido sin actividad endotóxica
- No produce exotoxinas
- Produce hialuronidasa
- Adhesinas (tp0155; Tp 0483)**: unión a fibronectina (expresión de ICAM-1 y adherencia de monocitos por CD43)
- Adherencia íntima de membranas celulares y envolturas del treponema
- Evasión** de los mecanismos de defensa innata y adaptativa por enmascaramiento con:
 - fosfolípidos de huésped
 - proteínas del huésped
- Anticuerpos contra lípidos del huésped
- Endoarteritis obliterativa**



Sífilis: formación del chancro de inoculación



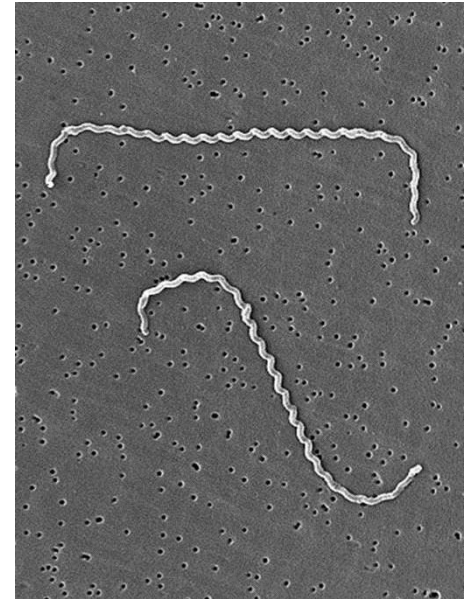
Chancro de inoculación (sífilis primaria)



Posteriormente sífilis secundaria y sífilis terciaria

***Leptospira interrogans* y leptospirosis**

- Aerobias estrictas
 - Crecen en medios enriquecidos (Fletcher)
 - Crecimiento lento (hasta 12 semanas)
 - Temperatura óptima de desarrollo: 28-30°C
 - Sobrevive varios días en agua a pH > 7
 - Pierden viabilidad en medios ácidos
 - Sensibles a la desecación
 - Sensibles a muchos desinfectantes
-
- Doce 12 especies y 7 genomoespecies
 - *Leptospira interrogans*: especie prevalente en el hombre
 - Especies y genomoespecies subclasificadas en serogrupos y serovariedades (>260)



***Leptospira interrogans* y leptospirosis**

- Enfermedad zoonótica más ampliamente distribuida en el mundo y quizás la más prevalente.
- Enfermedad infecciosa emergente, según la OMS.
- En América Central y Sudamérica: brotes durante inundaciones por lluvias asociadas al fenómeno de la corriente de El Niño.
- Argentina: 50/100 casos esporádicos/año.
- Puertas de entrada más comunes: abrasiones cutáneas y la conjuntiva.
- No se transmite por contacto interhumano.
- Reservorio: aguas contaminadas con orina de animales enfermos (huéspedes permanentes: roedores; huéspedes accidentales: hombre, perro, animales de granja).

***Leptospira interrogans* y leptospirosis**

Fase I: aguda o septicémica.

- 1ª semana: fiebre alta ondulante, cefalea, mialgias, inyección conjuntival.
- Existe leptospiremia.

Fase II: fase secundaria o inmunitaria.

- 2ª semana: complicaciones asociadas a la localización primaria de las leptospiras: vasculitis, infiltrados inflamatorios y daño endotelial (¿depósito de inmunocomplejos?). Nefropatía severa con insuficiencia renal. Compromiso hepático: ictericia.
- Existe leptospiruria.

Muchas gracias!

Bibliografía de respaldo:

Murray PR y col. Microbiología Médica, Ed. Elsevier-Mosby, 7ª ed., 2014.
Sordelli DO y col. Bacteriología Médica. Ed. La Librería de las Ciencias, 2006.