

### TEÓRICO 3: BACILOS GRAM NEGATIVOS

#### Enterobacterias y Géneros *Brucella* y *Pseudomonas*

#### ENTEROBACTERIAS (EB) Y SU PATOGENIA

IMPORTANTE: No confundir “bacterias entéricas” (bacterias que habitan en el intestino) con “Enterobacterias” (bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*). Muchas enterobacterias habitan el intestino humano (Ej.: *E coli*, *Proteus*, etc.) otras son patógenos primarios (es decir que no colonizan el intestino del humano) por ej.: *Salmonella*, *Shigella*, etc. Por otro lado, en el intestino habitan bacterias que no son Enterobacterias por ej *Bacteroides*, *Clostridium*, etc.

Las Enterobacterias (EB) tienen gran importancia en el ámbito hospitalario donde pueden causar infecciones respiratorias, urinarias, de heridas y del SNC. ¿Por qué? Los individuos hospitalizados (a los que se considera como “inmunodeprimidos”) pueden colonizar su orofaringe con EB (a diferencia de los individuos inmunocompetentes). Desde la orofaringe, estos microorganismos pueden descender (por aspiración o por la intubación para el uso de respiradores) y causar infecciones respiratorias. Las infecciones urinarias intrahospitalarias se asocian con el uso de sondas vesicales. Éstas sirven como vía de entrada de las EB (y otros patógenos) que colonizan la zona perineal y perianal. La infección de las heridas quirúrgicas con EB se asocian a falta de asepsia durante (más rara) o luego de la intervención. Recordar que las EB pueden estar presentes en forma temporaria en la piel por lo que no sólo el enfermo, sino que el personal de salud puede ser fuente y reservorio de EB. El lavado de manos es fundamental para evitar las infecciones intrahospitalarias. Un agravante es que las bacterias (EB y otras) del ámbito hospitalario son, con mucha frecuencia, resistentes y multiresistentes a los antibióticos.

Las infecciones del SNC por EB dentro del hospital están por lo general asociadas a bacterias capsuladas, principalmente *E. coli* K1 (ECK1). Este patógeno causa meningitis del recién nacido, cuando la madre está colonizada en su tracto vaginal con esta bacteria. El niño se coloniza durante el parto, EC K1 puede aislarse de naso- y oro-faringe como así también de materia fecal del recién nacido. EC K1 es una bacteria invasiva y desde estos tejidos puede alcanzar la circulación, sobrevivir en el torrente sanguíneo y llegar a meninges.

Otra EB que puede causar sepsis y meningitis en el recién nacido es *Klebsiella pneumoniae*, que también es capsulada.

UN CONCEPTO IMPORTANTE: A partir de infecciones urinarias, respiratorias o de heridas, las EB pueden alcanzar el torrente sanguíneo; dependiendo de la cantidad de bacterias y de las condiciones del individuo infectado, la bacteriemia puede ser transitoria o desencadenar cuadros clínicos tan graves como sepsis. Las bacterias capsuladas tienen mayor capacidad de permanecer en circulación. Como veremos más adelante en la materia y en Microbiología II, la presencia de la bacteria en circulación no es condición “*sine qua non*” para que tenga lugar la sepsis, es suficiente con que pasen a sangre las moléculas capaces de desencadenarlo (endotoxina, ácidos teicoicos, ciertas exotoxinas, etc.)

En los individuos de la comunidad, las EB pueden causar infecciones urinarias, principalmente en la mujer (durante toda su vida) y en el varón (en los extremos de la vida). Estas infecciones son endógenas, es decir, se producen por las bacterias que colonizan el

colon del propio individuo. Por el contrario, las EB que causan infecciones gastrointestinales son patógenos primarios (no forman parte de la microbiota del individuo; sí son parte, muchas veces, de la microbiota de animales como vacas, aves, reptiles, etc.).

## **INFECCIONES INTESTINALES QUE CAUSAN LOS VIROTIPOS DE *E coli***

*E. coli* enteropatógena (ECEP) causa diarreas acuosas, infecta el intestino delgado, y es un patógeno frecuente de diarreas infantiles. Los individuos se infectan a través de la ingesta de agua o alimentos contaminados.

*E. coli* enterotoxigénica (ECET) causa la diarrea del viajero (tanto en niños como en adulto) estas infecciones tienen lugar cuando un individuo que reside en una región libre de ECET viaja a una zona endémica y consume agua o alimentos contaminados. Produce diarrea acuosa, infecta el intestino delgado.

*E. coli* enterohemorrágica (ECEH) causa diarreas sanguinolentas, asociadas al consumo de carne picada mal cocida, o alimentos crudos que han estado en contacto con carne cruda (contaminación horizontal). Otros alimentos relacionados con esta infección son: leche o jugos de fruta sin pasteurizar, aguas contaminadas con heces de ganado vacuno (ríos, arroyos) vegetales lavados con estas aguas, etc. ECEH habita el intestino de las vacas, durante la faena, la superficie de la carne se contamina con materia fecal conteniendo la bacteria. Si la carne cruda se pone en contacto con alimentos que van a ser consumidos crudos (ej. cortar vegetales sobre la misma tabla donde se apoyó la carne cruda) éstos pueden ser la vía de infección. Si la carne se cocina entera (no se hace carne picada), la bacteria contaminante destruye con el calor; pero si la carne contaminada se pica y se preparan hamburguesas, ahora ECEH está tanto por fuera como por dentro. Si la hamburguesa no se cocina bien, este puede ser el alimento que causa la infección. La leche puede contaminarse con materia fecal durante el proceso del ordeño, si ésta se consume sin pasteurizar también puede ser fuente de infecciones. Por último, muchas veces los árboles frutales crecen en campos donde pasta el ganado vacuno. Las frutas para producir jugos se recogen no sólo de la planta sino también de las que han estado en el suelo, en contacto con heces del ganado. Si el jugo de frutas producido no es pasteurizado puede ser también vía de infección. La infección por ECEH puede causar el síndrome urémico hemolítico (SUH) por acción de la toxina similar a la de Shiga.

*E. coli* enteroinvasiva (ECEI) es el único virotipo de *E coli* que produce diarreas que es invasivo (*E coli* K1 también es invasivo, pero no causa diarreas). Causa una infección en el colon y la diarrea que produce es similar a la disentería que causa *Shigella*.

*E. coli* enteroagregativa (ECEA) y *E. coli* adherencia difusa (ECAD) se asocian a diarreas infantiles.

## **VIROTIPOS DE *E coli***

La evolución de *E coli* desde comensal a patógena se relaciona a la adquisición de factores de virulencia mediante elementos génicos móviles (transferencia horizontal de genes).

Algunos ejemplos:

Transposones: toxina termoestable de ECET

Plásmidos: toxina termolabil de ECET; factores de invasión de ECEI

Bacteriofago: toxina similar a la Shiga en ECEH

Islas de patogenidad: proteínas para el borrado de las microvellosidades en ECEP/ECEH; factores de adherencia en ECUP

## PATOGENIA DE LOS VIROTIPOS DE *E. coli*

### *E. coli* uropatógena (ECUP)

El primer desafío para ECUP es trasladarse desde el colon y establecerse en el tracto urinario (TU) donde utiliza péptidos y aminoácidos como fuente primaria de carbono. Los factores de virulencia le permiten ascender desde al uretra a la vejiga y riñones (evadiendo la inmunidad innata y evitando la eliminación por la micción) e incluyen fimbrias, secreción de toxinas, múltiples sistemas de adquisición de Fe. La entrada de ECUP al TU es seguida por la adherencia al uroepitelio. Esta adherencia está mediada por la adhesina fímbrica H (FimH) que se encuentra en el extremo de la fimbria tipo 1 (y sufre variación de fase). FimH se une a la UROPLAKINA Ia glicosilada que recubre las células superficiales del epitelio de la vejiga. La interacción de FimH con UROPLAKINA IIIa llevan a la invasión de la bacteria y la apoptosis celular (se cree que a partir de esa interacción se inician eventos de fosforilación que estimularían ciertos caminos, hasta hoy desconocidos). La invasión de ECUP también está mediada por la interacción de FimH integrinas como alfa 3 y beta 3, asociadas a la desestabilización de microtúbulos de actina (no es necesario que recuerden el nombre de las integrinas). Una vez internalizada ECUP puede dividirse rápidamente y formar complejos similares a las biopelículas (CBI) que sirven como ambientes protectivos transitorios. ECUP puede permanecer por largos períodos en CBI y este fenómeno podría explicar las infecciones recurrentes que sufren ciertos pacientes; por otro lado, ECUP puede abandonar la CBI y entrar a la luz de la vejiga. Durante la infección, el daño tisular causado por los PMN, la adherencia, invasión y apoptosis generados por la bacteria llevan a la exfoliación de las células superficiales y a la exposición del epitelio de transición. Las células del epitelio de transición también pueden ser invadidas por la bacteria que luego de la internalización son contenidas en vesículas inmersas en fibras de actina, donde la replicación está restringida. Este estado puede actuar también como reservorio protegido de la inmunidad del individuo y permitir la permanencia prolongada en la vejiga.

Las infecciones urinarias que no son tratadas convenientemente pueden dar origen a infecciones ascendentes. El ascenso al riñón está mediado por la regulación recíproca de la fimbria 1 y la motilidad. La bacteria que expresa fimbria tipo 1 está menos flagelada que la que no la expresa, esto sugiere que cuando se “apaga” la expresión de la fimbria 1 ECUP se vuelve más móvil. La motilidad le permite a ECUP ascender de la vejiga al riñón. Las cepas de ECUP asociadas a pielonefritis a menudo expresan fimbrias P, que se unen a globósidos, abundantes en la superficie de las células epiteliales renales. En forma similar a la relación inversa descrita para fimbria 1 y motilidad, la expresión de la fimbria P se asocia a menor cantidad de flagelos y represión de la motilidad.

*E. coli* K1 (ECK1) es un habitante frecuente del intestino; se asocia con infecciones del SNC del recién nacido (RN). Para ello la bacteria tiene que pasar desde la orofaringe o desde el intestino del RN, a sangre y atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). ECK1 puede atravesar los epitelios del RN por transcitosis. La progresión de la enfermedad dependerá de la magnitud de la bacteriemia (debería ser mayor a 1.000 unidades formadoras de colonias/ml

de sangre; no es necesario que recuerden esta cifra simplemente es para señalar que no siempre que haya bacteriemia resultará en enfermedad). La sobrevivencia de la bacteria en sangre es facilitada por la presencia de una cápsula antifagocítica de ácido polisialico. Además cuenta con una proteína de membrana externa (OmpA) que inhibe la activación del complemento por la vía clásica. Por otro lado, ECK1 es capaz de invadir macrófagos, inhibir la apoptosis y la liberación de quemoquinas y de esta forma se provee de un nicho donde replicarse antes de una nueva diseminación por sangre.

En la BHE, ECK1 se adhiere mediante la FimH y OmpA (además participan las proteínas Ibe y un factor necrotizante citotóxico). La invasión comprende rearrreglos de actina y miosina. La cápsula también participa de la invasión porque previene la fusión del lisosoma y permite la liberación de la bacteria viva a través de la BHE. Colectivamente estos mecanismos permiten que ECK1 penetre la BHE y gane acceso al SNC donde causa edema, inflamación y daño.

ECEP y ECEH son patógenos que producen lesiones por el mecanismo de adherencia y borrado de las microvellosidades (en algunos textos lo van a encontrar como mecanismo A/E (del inglés: adherence / effacing). En el caso de ECEP la información para poder lograr estas lesiones está codificada en una isla de patogenicidad (denominada LEE, del inglés locus enterocyte effacement, no es necesario que recuerden el nombre de la isla). LEE codifica para un sistema de secreción tipo tres (SSTT) que permite translocar proteínas efectoras al citoplasma del enterocito.

La adherencia inicial de ECEP está mediada por las fimbrias BFP (del inglés bundle forming pili = pili que forma manojos). Estas fimbrias favorecen la interacción entre bacterias para formar microcolonias y también la interacción con los enterocitos a través de receptores. Luego, una adherencia más íntima es mediada por una proteína de membrana externa, llamada intimina y su receptor denominado Tir (del inglés: translocated intimin receptor). El nombre señala una característica de la patogenia de ECEP, que mediante el SSTT transloca primero el receptor Tir al interior del enterocito. Tir luego se presenta en la superficie del enterocito y actúa como receptor de la intimina. La interacción entre Tir e intimina resulta en la fosforilación de Tir y rearrreglos de los filamentos de actina que forman el pedestal y el borrado de las microvellosidades. Otros efectores (en la figura aparecen como EspG, EspF, Map, NleA; no es necesario que recuerden estos nombres) son translocados a través del SSTT que participan de la desestabilización de las uniones fuertes entre enterocitos, la desregulación de las bombas de iones y la descolocación de canales de transporte de agua (llamadas acuaporinas). En conjunto, el borrado de las microvellosidades, la desregulación de la bomba de iones, la alteración de los canales de agua, y la disrupción de las uniones fuertes afectan seriamente la reabsorción de agua y son la causa de la diarrea.

ECEH forma el pedestal y borra las microvellosidades mediante un mecanismo prácticamente igual al de ECEP (En ECEH el Tir no se fosforila). También inyecta efectores similares a los translocados por ECEP. A diferencia de ECEP, ECEH secreta además una toxina (toxina similar Shiga, codificada por un fago) del tipo A/B. Donde A es la unidad activa que actúa a nivel ribosomal, inhibiendo la síntesis de proteínas y causando la muerte celular. B se une al receptor Gb3 (globotriaosilceramida, no es necesario que recuerden el nombre completo) que está presente en los enterocitos, en las células de Paneth, y en células del endotelio intestinal y renal. La acción de esta toxina se asocia al síndrome urémico hemolítico (SUH) y es la causa de la presencia de sangre en las heces de los infectados.

ECET se adhiere inicialmente al enterocito mediante fimbrias CFA y por una adhesina del extremo de su flagelo. Una adherencia más íntima es mediada por otras adhesinas afímbricas. ECET secreta dos toxinas una termolábil (TL) y otra de menor peso molecular, termoestable (TS). La toxina TL aumenta los niveles de AMPc y es funcional y estructuralmente idéntica a la toxina colérica. La toxina TS produce un aumento de GMPc. El efecto de las toxinas se ejerce sobre un canal de cloro (CFTR, del inglés cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; este es el canal de cloro afectado en los pacientes con fibrosis quística o fibroquística. No es necesario que recuerden esta información). La pérdida de cloro genera la pérdida de H<sub>2</sub>O generando la diarrea acuosa.

ECEI (y *Shigella*). Estos patógenos son invasivos, es decir que atraviesan el epitelio intestinal y alcanzan la submucosa donde desencadenan una fuerte respuesta inflamatoria. Ambas bacterias tienen el mismo mecanismo de patogénesis.

*Shigella* atraviesa el epitelio por transcitosis de la célula M e invade a los macrófagos dentro de los cuales se replica. Estos patógenos pueden activar la vía de las caspasas e inducir la apoptosis de los macrófagos, liberándose las bacterias en la submucosa. *Shigella* invade ahora los enterocitos por la membrana basal, por un mecanismo que involucra la traslocación de proteínas efectoras mediante el SSTT. Algunos de estos efectores producen el rearrreglo de los microfilamentos de actina, proporcionándole a este microorganismo -que es inmóvil- un mecanismo de propulsión. Así, la bacteria puede desplazarse lateralmente de enterocito en enterocito, destruyendo el epitelio y causando un cuadro llamado disentería (esto ocurre en el colon) que no se caracteriza por una gran pérdida de líquido sino más bien por deposiciones de poco volumen pero sanguinolentas y mucopurulentas. El paciente puede sufrir de fuerte dolor abdominal y fiebre. Las infecciones por *Shigella dysenteriae* son más graves porque esta especie de *Shigella* produce la toxina de Shiga, similar a la descrita para ECEH pero codificada en el cromosoma (por el contrario, las otras 3 especies de *Shigella* y ECEI no producen la toxina).

*Salmonella enterica* cuenta con más de 2500 serovariedades. Entre ellas, las serovariedades Typhimurium y Enteritidis causan infección intestinal en el hombre. La serov Typhi, por otro lado, causa una infección sistémica llamada fiebre tifoidea. *Salmonella* invade el epitelio intestinal utilizando el SSTT, para inyectar proteínas efectoras en el enterocito que entre otros efectos, produce el rearrreglo de los filamentos de actina y genera la endocitosis de la bacteria. Las serovariedades Typhimurium y Enteritidis al invadir el epitelio generan una fuerte respuesta inflamatoria en la submucosa, desestabilizando el epitelio intestinal y causando diarrea, que en ocasiones puede ser sanguinolenta. Por el contrario, la serov. Typhi, genera muy leve reacción inflamatoria intestinal y una vez atravesada la barrera del epitelio intestinal disemina hacia el torrente sanguíneo dentro de fagocitos, causando una infección sistémica e infectando diferentes órganos (bazo, hígado, hueso, etc).

¿Por qué *Salmonella* serov Typhi genera escasa reacción inflamatoria?

*Salmonella enterica* serov. Typhi, a diferencia de las serov Typhimurium o Enteritidis, produce una cápsula polisacáridica, conocida como antígeno Vi (antígeno de virulencia) que enmascara el LPS de modo tal que no puede ser reconocido por el TLR4. De esta forma, en el intestino, Typhi no genera una respuesta inflamatoria (que permitiría limitar la infección a la submucosa) y escapa a circulación dentro de fagocitos causando infección sistémica.

El género *Brucella* no pertenece a la familia de las Enterobacterias. Son cocobacilos gram-negativos que causan infección en animales del ganado bovino, caprino, porcino y en animales domésticos como el perro. A diferencia de lo que vimos para las enterobacterias, no se encuentran mayormente en el intestino de los animales sino en los órganos reproductores y glándulas accesorias, como las mamas. De allí que una de las vías de transmisión de *Brucella* sea la ingestión de leche sin pasteurizar o productos lácteos elaborados con leche sin pasteurizar. (OJO: *Brucella* no contamina la carne, como vimos en el caso de ECEH, porque no está en la materia fecal del animal). Otra vía es el ingreso de la bacteria a través de microlesiones en la piel, en aquellos individuos que están en contacto con los animales infectados, como los veterinarios.

Luego de llegar al intestino, *Brucella* invade el epitelio en forma similar al visto para *Salmonella* Typhi sin generar inflamación. De hecho, ambas, *S. Typhi* y *Brucella* spp. inducen una débil respuesta de fase aguda, con bajos niveles de TNF-alfa, INF-gamma e IL-1beta. Esto se explica porque tanto *S. Typhi* como *Brucella* spp. evaden el reconocimiento por los receptores TLR4 y TLR5. Sin embargo EL MECANISMO DE EVASION ES DIFERENTE. Recuerden que TLR4 reconoce LPS y TLR5 reconoce flagelina.

Esta “falta de reconocimiento” por el huésped que implica la ausencia de la reacción inflamatoria local, en el intestino, permite que tanto *S. Typhi* como *Brucella* spp. alcancen el torrente sanguíneo y causen infección sistémica, con compromiso de órganos como el hígado, bazo, médula ósea, etc.

(Entonces, la inflamación ¿es beneficiosa o perjudicial?)

---

PATOGENIA DE *Pseudomonas aeruginosa* (No pertenece a la familia de las enterobacterias).

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo gram-negativo no fermentador de la glucosa que es ambiental y oportunista. En los individuos sin condiciones predisponentes *Pseudomonas* no causa enfermedad. Sin embargo en los epitelios o mucosas dañadas o cuando se atraviesa las barreras protectoras como la piel, *Pseudomonas* puede producir múltiples patologías; entre ellas a nivel de vías respiratorias, urinarias, oftalmológicas y sobre piel y tejidos blandos.

La adherencia a las células del huésped se produce mediante adhesinas fímbricas y afímbricas. La adherencia de fimbrias de *Pseudomonas* es mayor en epitelios en los que se ha removido el ácido siálico (como los epitelios dañados, por ejemplo). De todos modos, este patógeno oportunista posee una neuraminidasa, que remueve el ácido siálico de los epitelios, le permite a *Pseudomonas* dejar en descubierto los receptores de las fimbrias.

Posee varias exotoxinas y exoenzimas que tienen efecto sinérgico en la producción de la patología. En primer lugar, la exotoxina A (ExoA) como modelo de toxina internalizable tipo A/B. Esta, como muchas de las toxinas tipo A/B, tienen 3 dominios: uno de unión a receptor, otro denominado dominio trans-membrana y un tercero denominado dominio activo o “efector”. Su mecanismo de acción tiene varios pasos: a) el dominio de unión se adhiere a su receptor específico, b) se produce la internalización endosomal, c) cambio de conformación del dominio transmembrana por cambio de pH en el endosoma, d) inserción del dominio transmembrana en la membrana endosomal y e) liberación del dominio activo en el citoplasma. Una vez sucedidos todos estos pasos, el dominio activo en este caso puntual,

actúa produciendo una ADP-ribosilación del factor de elongación-2, inhibiendo de este modo la síntesis de proteínas a nivel de varios tipos celulares (células pulmonares, renales, hepáticas y fibroblastos de tejido conectivo). Este mecanismo de acción es idéntico al que presenta toxina diftérica.

Toxinas tipo Exo de *Pseudomonas aeruginosa*. Dentro de este grupo podemos describir: ExoU, ExoY, ExoT y ExoS. Estas toxinas poseen diferentes actividades, dentro de las cuales algunas se ejemplifican en la diapo (ExoU: fosfolipasa, ExoY: adenilato ciclasa). Presentan una diferencia importante en relación con exotoxina A en cuanto a la forma en que son liberadas: mientras que exotoxina A es liberada al medio extracelular, estas toxinas tipo Exo son inyectadas a la célula huésped a través de un sistema de secreción tipo III en forma directa. En este sistema de secreción intervienen muchas proteínas estructurales (las que forman la jeringa molecular) y otras regulatorias, tales como chaperonas que guían a los efectores Exo hacia el sistema de secreción y otras que regulan la secreción de las toxinas.

Las toxinas Exo actúan en infecciones agudas y en las etapas iniciales de la infección. Producen daño en forma sinérgica y tienen importancia tanto en las infecciones respiratorias como en la de piel y partes blandas.

Los efectos producidos por las toxinas de *Pseudomonas aeruginosa* son varios: disrupción de barreras tisulares, disfuncionalidad del sistema inmune, aumento de respuesta inflamatoria, y ayuda a la diseminación hematógena de la bacteria con el consiguiente riesgo de shock séptico.

La elastasa de *Pseudomonas aeruginosa* es un ejemplo de exoenzima; no daña las células, puede degradar la elastina del tejido celular subcutáneo y de los vasos periféricos, permitiendo el acceso más fácil de la bacteria a tejidos profundos. También puede degradar IgA, factores de complemento, etc., actuando como “factor de diseminación”, sin dañar en forma directa a las células del huésped.

Para entender la patogenia de *Pseudomonas aeruginosa* debemos recordar que muchos de los factores de patogenia de este microorganismo (especialmente aquellos que son secretados por la bacteria) están regulados por el sistema de autoinducción o *quorum sensing*. Así, *Pseudomonas aeruginosa* secretará la mayoría de los factores de virulencia (elastasa, hemolisinas, exotoxinas, pigmentos, etc) cuando el número de bacterias alcanza un cierto nivel. Por lo tanto, si están dadas las condiciones de desarrollo de la bacteria (por ejemplo, sobre epitelios dañados como en los pacientes quemados, o en el epitelio respiratorio de un paciente fibroquístico o con EPOC, *Pseudomonas* alcanzará una densidad bacteriana suficiente para secretar muchos de sus factores de virulencia y podrá causar la enfermedad.