



MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGIA

Licenciatura en Enfermería
Segundo Cuatrimestre

Enero – Abril

Marco Estratégico de Referencia

Antecedentes históricos

Nuestra Universidad tiene sus antecedentes de formación en el año de 1978 con el inicio de actividades de la normal de educadoras “Edgar Robledo Santiago”, que en su momento marcó un nuevo rumbo para la educación de Comitán y del estado de Chiapas. Nuestra escuela fue fundada por el Profesor Manuel Albores Salazar con la idea de traer educación a Comitán, ya que esto representaba una forma de apoyar a muchas familias de la región para que siguieran estudiando.

En el año 1984 inicia actividades el CBTiS Moctezuma Ilhuicamina, que fue el primer bachillerato tecnológico particular del estado de Chiapas, manteniendo con esto la visión en grande de traer educación a nuestro municipio, esta institución fue creada para que la gente que trabajaba por la mañana tuviera la opción de estudiar por las tardes.

La Maestra Martha Ruth Alcázar Mellanes es la madre de los tres integrantes de la familia Albores Alcázar que se fueron integrando poco a poco a la escuela formada por su padre, el Profesor Manuel Albores Salazar; Víctor Manuel Albores Alcázar en julio de 1996 como chofer de transporte escolar, Karla Fabiola Albores Alcázar se integró en la docencia en 1998, Martha Patricia Albores Alcázar en el departamento de cobranza en 1999.

En el año 2002, Víctor Manuel Albores Alcázar formó el Grupo Educativo Albores Alcázar S.C. para darle un nuevo rumbo y sentido empresarial al negocio familiar y en el año 2004 funda la Universidad Del Sureste.

La formación de nuestra Universidad se da principalmente porque en Comitán y en toda la región no existía una verdadera oferta educativa, por lo que se veía urgente la creación de una institución de educación superior, pero que estuviera a la altura de las exigencias de los jóvenes que tenían intención de seguir estudiando o de los profesionistas para seguir preparándose a través de estudios de posgrado.

Nuestra universidad inició sus actividades el 19 de agosto del 2004 en las instalaciones de la 4ª avenida oriente sur no. 24, con la licenciatura en puericultura, contando con dos grupos de cuarenta alumnos cada uno. En el año 2005 nos trasladamos a las instalaciones de carretera Comitán – Tzimol km. 57 donde actualmente se encuentra el campus Comitán y el corporativo UDS, este último, es el encargado de estandarizar y controlar todos los procesos operativos y educativos de los diferentes campus, así como de crear los diferentes planes estratégicos de expansión de la marca.

Misión

Satisfacer la necesidad de educación que promueva el espíritu emprendedor, basados en Altos Estándares de calidad Académica, que propicie el desarrollo de estudiantes, profesores, colaboradores y la sociedad.

Visión

Ser la mejor Universidad en cada región de influencia, generando crecimiento sostenible y ofertas académicas innovadoras con pertinencia para la sociedad.

Valores

- Disciplina
- Honestidad
- Equidad
- Libertad

Escudo



El escudo del Grupo Educativo Albores Alcázar S.C. está constituido por tres líneas curvas que nacen de izquierda a derecha formando los escalones al éxito. En la parte superior está situado un cuadro motivo de la abstracción de la forma de un libro abierto.

Eslogan

“Pasión por Educar”

Balam



Es nuestra mascota, su nombre proviene de la lengua maya cuyo significado es jaguar. Su piel es negra y se distingue por ser líder, trabaja en equipo y obtiene lo que desea. El ímpetu, extremo valor y fortaleza son los rasgos que distinguen a los integrantes de la comunidad UDS.

MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

OBJETIVO GENERAL

Introducir al alumno en el mundo microscópico: los microorganismos, sus características estructurales y biológicas. Conocer los factores que afectan al crecimiento bacteriano y las metodologías a utilizar para su control. Entrar en contacto con los diferentes grupos de bacterias, eucariotas y virus patógenos. Conocer la relación huésped-hospedador que da lugar a los mecanismos de infección e inmunidad.

UNIDAD I

CONCEPTO Y DESARROLLO HISTORICO DE LA MICROBIOLOGIA

- 1.1 Concepto de Microbiología
- 1.2 Historia de la microbiología
- 1.3 Tipos de microorganismos
- 1.4 Clasificación biológica de los microorganismos en función del grado evolutivo y tipo de célula
- 1.5 Diferencia entre microorganismos celulares y acelulares
- 1.6 Características anatomo-morfológicas y fisiológicas de los virus.
- 1.7 Clasificación de los virus en función a su impacto médico.

- 1.1 Concepto de Microbiología
- 1.2 Historia de la microbiología

UNIDAD II

BACTERIOLOGIA

- 2.1 Características bacterianas
- 2.2 Clasificación, morfología y estructura de las bacterias
- 2.3 Metabolismo y crecimiento bacteriano
- 2.4 Genética bacteriana
- 2.5 Patogenicidad microbiana
- 2.6 Flora microbiana
- 2.7 Enfermedades bacterianas

UNIDAD III

MICOLOGIA

- 3.1 Generalidades sobre hongos de interés médico
- 3.2 Biología de hongos microscópicos
- 3.3 Tipos de micosis
- 3.4 Pseudomicosis
- 3.5 Relación entre enfermedades microbiológicas y la presencia de protozoarios
- 3.6 Generalidades sobre los protozoarios de interés médico.
- 3.7 Principales enfermedades provocadas por protozoarios.

UNIDAD IV

DESINFECCION Y ESTERILIZACION

- 4.1 Conceptos generales de desinfección, sanitización y esterilización
- 4.2 Diferenciación entre asepsia y antisepsia.
- 4.3 Agentes químicos desinfectantes y esterilizantes
- 4.4 Métodos y herramientas utilizados para éste fin.
- 4.5 Efectos de la esterilización y desinfección.

Criterios de evaluación:

No	Concepto	Porcentaje
1	Trabajos Escritos	10%
2	Actividades web escolar	20%
3	Actividades Áulicas	20%
4	Examen	50%
Total de Criterios de evaluación		100%

UNIDAD I

HISTORIA DE LA MICROBIOLOGIA

La Microbiología se puede definir, sobre la base de su etimología, como la ciencia que trata de los seres vivos muy pequeños, concretamente de aquellos cuyo tamaño se encuentra por debajo del poder resolutivo del ojo humano. Esto hace que el objeto de esta disciplina venga determinado por la metodología apropiada para poner en evidencia, y poder estudiar, a los microorganismos. Precisamente, el origen tardío de la Microbiología con relación a otras ciencias biológicas, y el reconocimiento de las múltiples actividades desplegadas por los microorganismos, hay que atribuirlos a la carencia, durante mucho tiempo, de los instrumentos y técnicas pertinentes. Con la invención del microscopio en el siglo XVII comienza el lento despegue de una nueva rama del conocimiento, inexistente hasta entonces. Durante los siguientes 150 años su progreso se limitó casi a una mera descripción de tipos morfológicos microbianos, y a los primeros intentos taxonómicos, que buscaron su encuadramiento en el marco de los "sistemas naturales" de los Reinos Animal y Vegetal.

El asentamiento de la Microbiología como ciencia está estrechamente ligado a una serie de controversias seculares (con sus numerosas filtraciones de la filosofía e incluso de la religión de la época), que se prolongaron hasta finales del siglo XIX. La resolución de estas polémicas dependió del desarrollo de una serie de estrategias experimentales fiables (esterilización, cultivos puros, perfeccionamiento de las técnicas microscópicas, etc.), que a su vez dieron nacimiento a un cuerpo coherente de conocimientos que constituyó el núcleo aglutinador de la ciencia microbiológica. El reconocimiento del origen microbiano de las fermentaciones, el definitivo abandono de la idea de la generación espontánea, y el triunfo de la teoría germinal de la enfermedad, representan las conquistas definitivas que dan carta de naturaleza a la joven Microbiología en el cambio de siglo.

Tras la Edad de Oro de la Bacteriología, inaugurada por las grandes figuras de Pasteur y Koch, la Microbiología quedó durante cierto tiempo como una disciplina descriptiva y aplicada, estrechamente imbricada con la Medicina, y con un desarrollo paralelo al de la Química, que le aportaría varios avances metodológicos fundamentales. Sin embargo, una corriente, en principio minoritaria, dedicada a los estudios básicos centrados con ciertas bacterias del suelo poseedoras de capacidades metabólicas

especiales, incluyendo el descubrimiento de las que afectan a la nutrición de las plantas, logró hacer ver la ubicuidad ecológica y la extrema diversidad fisiológica de los microorganismos. De esta forma, se establecía una cabeza de puente entre la Microbiología y otras ciencias biológicas, que llegó a su momento decisivo cuando se comprobó la unidad química de todo el mundo vivo, y se demostró, con material y técnicas microbiológicas que la molécula de la herencia era el ADN. Con ello se asiste a un íntimo y fértil intercambio entre la Microbiología, la Genética y la Bioquímica, que se plasma en el nacimiento de la Biología Molecular, base del espectacular auge de la Biología desde mediados de este siglo.

Por otro lado, el "programa" inicial de la Microbiología (búsqueda de agentes infectivos, desentrañamiento y aprovechamiento de los mecanismos de defensa del hospedador) condujeron a la creación de ciencias subsidiarias (Virología, Inmunología) que finalmente adquirieron su mayoría de edad y una acentuada autonomía.

Por último, la vertiente aplicada que estuvo en la base de la creación de la Microbiología, mantuvo su vigencia, enriquecida por continuos aportes de la investigación básica, y hoy muestra una impresionante "hoja de servicios" y una no menos prometedora perspectiva de expansión a múltiples campos de la actividad humana, desde el control de enfermedades infecciosas (higiene, vacunación, quimioterapia, antibioterapia) hasta el aprovechamiento económico racional de los múltiples procesos en los que se hallan implicados los microorganismos (biotecnologías).

Así pues, la sencilla definición con la que se abrió este apartado, escondía todo un cúmulo de contenidos y objetos de indagación, todos emanados de una peculiar manera de aproximarse a la porción de realidad que la Microbiología tiene encomendada. En las próximas páginas ampliaremos y concretaremos el concepto al que hemos hecho rápida referencia. Realizaremos un recorrido por su el desarrollo de la Microbiología a lo largo de su historia, que nos permitirá una visión concreta de algunos de sus característicos modos de abordar su objeto de estudio; finalmente, estaremos en disposición de definir este último, desglosado como objeto material y formal.

DESARROLLO HISTÓRICO DE LA MICROBIOLOGÍA.

La Microbiología, considerada como una ciencia especializada, no aparece hasta finales del siglo XIX, como consecuencia de la confluencia de una serie de progresos metodológicos que se habían empezado a incubar lentamente en los siglos anteriores, y que obligaron a una revisión de ideas y prejuicios seculares sobre la dinámica del mundo vivo.

Siguiendo el ya clásico esquema de Collard (1976), podemos distinguir cuatro etapas o periodos en el desarrollo de la Microbiología:

1. Primer periodo, eminentemente especulativo, que se extiende desde la antigüedad hasta llegar a los primeros microscopistas.
2. Segundo periodo, de lenta acumulación de observaciones (desde 1675 aproximadamente hasta la mitad del siglo XIX), que arranca con el descubrimiento de los microorganismos por Leeuwenhoek (1675).
3. Tercer periodo, de cultivo de microorganismos, que llega hasta finales del siglo XIX, donde las figuras de Pasteur y Koch encabezan el logro de cristalizar a la Microbiología como ciencia experimental bien asentada.
4. Cuarto periodo (desde principios del siglo XX hasta nuestros días), en el que los microorganismos se estudian en toda su complejidad fisiológica, bioquímica, genética, ecológica, etc., y que supone un extraordinario crecimiento de la Microbiología, el surgimiento de disciplinas microbiológicas especializadas (Virología, Inmunología, etc), y la estrecha imbricación de las ciencias microbiológicas en el marco general de las Ciencias Biológicas. A continuación se realiza un breve recorrido histórico de la disciplina microbiológica, desglosando los períodos 3º y 4º en varios apartados temáticos.

Si bien el descubrimiento efectivo de seres vivos no visibles a simple vista debió aguardar hasta el último tercio del siglo XVII, sus actividades son conocidas por la humanidad desde muy antiguo, tanto las beneficiosas, representadas por las fermentaciones implicadas en la producción de bebidas alcohólicas, pan y productos lácteos, como las perjudiciales, en forma de enfermedades infecciosas.

Diversas fuentes escritas de la antigüedad griega y romana hablan de gérmenes invisibles que transmiten enfermedades contagiosas. Lucrecio (96-55 a.C.), en su "*De rerum natura*"

hace varias alusiones a "semillas de enfermedad". En el Renacimiento europeo, Girolamo Frascatorius, en su libro "*De contagione et contagionis*" (1546) dice que las enfermedades contagiosas se deben a "gérmenes vivos" que pasan de diversas maneras de un individuo a otro. Estos inicios de explicación que renunciaban a invocar causas sobrenaturales fueron probablemente catalizados por la introducción en Europa de la sífilis, una enfermedad en la que estaba clara la necesidad de contacto para su contagio. Pero la "cosa" que se transmite en la enfermedad siguió siendo objeto de conjeturas durante mucho tiempo.

Ya en el siglo XIV, con la invención de las primeras lentes para corregir la visión, surgió una cierta curiosidad sobre su capacidad de aumentar el tamaño aparente de los objetos. En el siglo XVI surgieron algunas ideas sobre aspectos de la física óptica de las lentes de aumento, pero no encontraron una aplicación inmediata. Se dice que Galileo hizo algunas observaciones "microscópicas" invirtiendo su telescopio a partir de lentes montadas en un tubo, pero en cualquier caso está claro que no tuvieron ninguna repercusión.

La primera referencia segura sobre el microscopio (1621) se debe a Constantijn Huygens, quien relata que el inglés Cornelis Drebbel tenía en su taller un instrumento magnificador, que recibió el nombre de *microscopium* en 1625, en la Accademia dei Lincei, de Roma.

El descubrimiento de los microorganismos fue obra de un comerciante holandés de tejidos, Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723), quien en su pasión por pulir y montar lentes casi esféricas sobre placas de oro, plata o cobre, casi llegó a descuidar sus negocios. Fabricó unos cuatrocientos microscopios simples, con los que llegó a obtener aumentos de casi 300 diámetros. En 1675 descubrió que en una gota de agua de estanque pululaba una asombrosa variedad de pequeñas criaturas a las que denominó "animálculos". En 1683 descubre las bacterias, por lo que se considera el "padre de la Microbiología". Durante varias décadas Leeuwenhoek fue comunicando sus descubrimientos a la Royal Society de Londres a través de una serie de cartas que se difundieron, en traducción inglesa, en las "*Philosophical Transactions*". Sus magníficas dotes de observador le llevaron asimismo a describir protozoos (como *Giardia*, que encontró en sus propias heces), la estructura estriada del músculo, la circulación capilar, a descubrir los espermatozoides y los glóbulos rojos (por lo que también se le considera el fundador de la Histología animal), así como a detallar diversos aspectos estructurales de las semillas y embriones de

plantas. Leeuwenhoek se percató de la abundancia y ubicuidad de sus animálculos, observándolos en vinagre, placa dental, etc.

Aunque los descubrimientos de Leeuwenhoek despertaron interés al ser comunicados, pocos intentaron o pudieron reproducirlos seriamente. Además, la fabricación de lentes sencillas de gran aumento era difícil y el manejo de los microscopios simples, bastante engorroso.

Simultáneamente el inglés Robert Hooke (1635-1703) usando microscopios compuestos, describió los hongos filamentosos (1667), y descubrió la estructura celular de las plantas (*Micrographia*, 1665), acuñando el término célula. Pero el trabajo con microscopios compuestos aplicados al estudio de los "animálculos" languideció durante casi 200 años, debido a sus imperfecciones ópticas, hasta que hacia 1830 se desarrollaron las lentes acromáticas.

La autoridad intelectual de Aristóteles por un lado, y la autoridad moral representada por la Biblia, por otro, junto con las opiniones de escritores clásicos como Galeno, Plinio y Lucrecio, a los que se citaba como referencias incontrovertibles en la literatura médica en la Edad Media y Renacimiento, dieron carta de naturaleza a la idea de que algunos seres vivos podían originarse a partir de materia inanimada, o bien a partir del aire o de materiales en putrefacción. Esta doctrina de la "*generatio spontanea*" o abiogénesis, fue puesta en entredicho por los experimentos de Francesco Redi (1621-1697), quien había acuñado la expresión "*Omne vivum ex ovo*" (1668), tras comprobar que los insectos y nematodos procedían de huevos puestos por animales adultos de su misma especie. Demostró que si un trozo de carne era cubierto con gasa de forma que las moscas no podían depositar allí sus huevos, no aparecían "gusanos", que él correctamente identificó como fases larvarias del insecto. Los descubrimientos de Redi tuvieron el efecto de desacreditar la teoría de la generación espontánea para los animales y plantas, pero la reavivaron respecto de los recién descubiertos "animálculos", de modo que aunque se aceptó la continuidad de la vida en cuanto a sus formas superiores, no todos estaban dispuestos a admitir el más amplio "*Omne vivum ex vivo*" aplicado a los microorganismos.

Hubo que esperar un siglo más hasta que una serie de naturalistas recomenzaran el ataque a la teoría preformacionista. Lazzaro Spallanzani (1729-1799) sostuvo una disputa con J.T. Needham (1713-1781) en la que el primero demostró que los "infusorios" no

aparecían en muestras de maceraciones animales o vegetales sometidas durante tiempo suficiente a ebullición en frascos herméticamente cerrados, pero volvían a aparecer si se practicaban agujeros en el recipiente. Sin embargo los preformacionistas no se daban por vencidos; el mismo Needham, recogiendo una idea ya expresada por Huygens, amigo de Leeuwenhoek, replicó -con argumentos vitalistas muy propios de la época- que el calor había destruido la "fuerza vegetativa" de las infusiones y había cambiado la "cualidad" del aire dentro de los frascos.

Durante el primer tercio del siglo XIX la doctrina de la arqueogénesis o generación espontánea recibió un último refuerzo antes de morir, debido por un lado a razones extracientíficas (el auge del concepto de transmutación producido por la escuela de la filosofía de la naturaleza), y por otro al descubrimiento del oxígeno y de su importancia para la vida, de modo que los experimentos de Spallanzani se interpretaron como que al calentarse las infusiones, el oxígeno del aire se destruía, y por lo tanto desaparecía la "fuerza vegetativa" que originaba la aparición de microorganismos.

Theodor Schwann (1810-1882) presentó en 1836 un método seguro para refutar la teoría abiogénica: calentó maceraciones en frascos a los que se había eliminado previamente el aire, pero no continuó trabajando en esta línea.

Para complicar más las cosas, la publicación de "*Sobre el origen de las especies*" por Darwin en 1859, fue utilizada por algunos preformacionistas para apoyar sus argumentos. El mismo Haeckel, en una fecha tan tardía como 1866, se mostraba escéptico ante las pruebas aportadas por Pasteur.

Fue, efectivamente Louis Pasteur (1822-1895) el que asestó el golpe definitivo y zanjó la cuestión a favor de la teoría biogénica. En un informe a la Académie des Sciences de París, en 1860 ("*Expériences relatives aux générations dites spontanées*") y en escritos posteriores comunica sus sencillos y elegantes experimentos: calentó infusiones en matraces de vidrio a los que estiraba lateralmente el cuello, haciéndolo largo, estrecho y sinuoso, y dejándolo sin cerrar, de modo que el contenido estuviera en contacto con el aire; tras esta operación demostró que el líquido no desarrollaba microorganismos, con lo que eliminó la posibilidad de que un "aire alterado" fuera la causa de la no aparición de gérmenes. Antes bien, comprobó que los gérmenes del aire quedaban retenidos a su paso por el largo cuello sinuoso, en las paredes del tubo, y no alcanzaban el interior del recipiente

donde se encontraba la infusión, quedando ésta estéril indefinidamente. Sólo si se rompía el cuello lateral o si se inclinaba el frasco de modo que pasara parte de líquido a la porción de cuello, los gérmenes podían contaminar la infusión y originar un rápido crecimiento.

En 1861 Pasteur publica otro informe en el que explica cómo se pueden capturar los "cuerpos organizados" del aire con ayuda de un tubo provisto de un tapón de algodón como filtro, y la manera de recuperarlos para su observación microscópica. De esta forma quedaba definitivamente aclarado el origen de los microorganismos, y se abría la Edad de Oro del estudio científico de las formas de vida no observables a simple vista.

Los últimos escépticos quedaron silenciados cuando en 1877 John Tyndall (1820-1893) aplicó su sistema de esterilización por calentamiento discontinuo (hoy conocida precisamente como tindalización), que evidenció la existencia de formas microbianas de reposo muy resistentes al calor, lo cual fue confirmado poco más tarde por Ferdinand Cohn al descubrir las esporas bacterianas.

Un segundo factor contribuyente al nacimiento de la ciencia microbiológica fue el establecimiento de la relación que une ciertas transformaciones químicas que se dan en las infusiones con el crecimiento de los gérmenes en ellas existentes. Cagniard-Latour en 1836, y Schwann y Kützing en 1837 habían sugerido que las levaduras eran las causantes de la fermentación alcohólica por la que el azúcar pasa a alcohol etílico y dióxido de carbono, pero se encontraron con la crítica adversa de los grandes químicos de la época (Berzelius, Wohler y Liebig). Liebig, hacia 1840, había realizado importantes confirmaciones a la "teoría mineral" sobre la nutrición de las plantas, enfrentándose a la "teoría del humus" sostenida por Thaer, asestando un golpe a las ideas vitalistas heredadas de Leibniz. Puesto que se consideraba a las levaduras como plantas microscópicas, se suponía que los procesos de fermentación y putrefacción se debían a fenómenos químicos de descomposición y muerte encuadrables en el marco de la teoría mineral de la fisiología vegetal. Su convencimiento de que toda actividad vital se podía explicar en términos de química y física retrasó por algún tiempo la adscripción de estos fenómenos a células vivas.

Fue Pasteur (que, desde sus primeros estudios sobre las propiedades ópticas de los cristales de tartrato, venía suponiendo que estos compuestos tenían un origen orgánico)

quien de nuevo intervino en el debate de forma decisiva. En 1857 demostró que los agentes de la fermentación láctica eran microorganismos, trabajando sobre un problema que había surgido entre los destiladores de Lille cuando en sus cubas la fermentación alcohólica se vio sustituida por una indeseable fermentación láctica. Este fue el inicio de una larga serie de estudios que habría de durar hasta 1876, en los que Pasteur identificó distintos microorganismos responsables de diferentes clases de procesos fermentativos. Así, en 1860 adscribe inequívocamente la fermentación alcohólica a ciertos tipos de levaduras, y en 1866, en sus *Études sur le vin* resume sus hallazgos al respecto, inaugurando la Microbiología Aplicada, una de las primeras derivaciones prácticas no empíricas emanadas de la Biología. A finales del siglo XIX eminentes biólogos como Hansen, en Copenhague, y Beijerinck, en Delft, desarrollaban su actividad en industrias y destilerías.

Trabajando sobre los agentes de la fermentación butírica, Pasteur descubrió la presencia de microorganismos que se desarrollaban en ausencia de oxígeno, lo cual desmentía la creencia de que todas las formas de vida necesitan aire para crecer. Acuñó los términos aerobiosis y anaerobiosis para denominar, respectivamente, a la vida en presencia y en ausencia de oxígeno.

Tras el descubrimiento de la anaerobiosis, el mismo Pasteur comprendió las distintas implicaciones energéticas subyacentes a la utilización de sustratos orgánicos en presencia y en ausencia de oxígeno, demostrando que, en el segundo caso el rendimiento (medido como crecimiento microbiano) era siempre menor, al no poder realizarse la degradación total de las correspondientes sustancias.

Una profundización en los fenómenos de fermentación llegó cuando en 1897 Buchner obtuvo, a partir de levaduras, una preparación enzimática (zimasa) que era capaz de realizar la misma transformación de "fermentación" que las células vivas. Este descubrimiento, que evocaba las propuestas de Berzelius y Liebig, supuso en realidad la confluencia de los enfoques químico y biológico: las fermentaciones eran procesos químicos catalizados por enzimas presentes dentro de células vivas, que podían ser estudiados extracelularmente. De esta forma, la Bioquímica, nacida como una rama de la química fisiológica, que se venía especializando en la enzimología, encontró una alianza fructífera y duradera con la joven Microbiología.

LOS AVANCES TÉCNICOS

La doctrina del pleomorfismo, vigente durante buena parte del siglo XIX, mantenía que los microorganismos adoptaban formas y funciones cambiantes dependiendo de las condiciones ambientales. A estas ideas se oponían frontalmente investigadores como Koch, Pasteur y Cohn, que estaban convencidos de la especificidad y constancia morfológica y fisiológica de cada tipo de microorganismo (monomorfismo). El pleomorfismo había surgido como una explicación a la gran variedad de formas y actividades que aparecían en un simple frasco de infusión, pero ya Pasteur, en sus estudios sobre la fermentación, se había percatado de que los cultivos que aparecían podían considerarse como una sucesión de distintas poblaciones de microorganismos predominantes, que, a resultas de sus actividades, condicionaban la ulterior composición de la comunidad microbiana. La solución definitiva a esta cuestión dependía, de nuevo, de un desarrollo técnico, que a su vez iba a suministrar una de las herramientas características de la nueva ciencia: los métodos de cultivo puro.

Los primeros cultivos puros fueron obtenidos por el micólogo Brefeld, quien logró aislar esporas de hongos y cultivarlas sobre medios sólidos a base de gelatina. Por su menor tamaño, este método se hacía inviable para las bacterias, por lo que se recurrió a un método basado en diluciones: Lister, en 1878 realizó diluciones secuenciales de cultivos mixtos, hasta lograr muestras en las que existía una sola célula. Pero la técnica era larga y tediosa y, además, normalmente sólo se lograban aislar células del tipo bacteriano más abundante en el cultivo original; sin embargo, el experimento sirvió para confirmar la naturaleza "particulada" de los agentes de las fermentaciones.

Por aquella época Koch buscaba con ahínco métodos más sencillos de cultivo puro, indispensables para proseguir sus investigaciones sobre bacterias patógenas. Primero (y quizá de forma un tanto casual) empleó rodajas de patata como sustrato sólido nutritivo sobre el que se podían desarrollar colonias macroscópicas de bacterias que presentaban morfología característica, que Koch interpretó como resultantes del crecimiento a partir de células individuales. Pero enseguida recurrió a compactar el típico caldo de cultivo a partir de carne (diseñado por Loeffler) añadiéndole gelatina (1881). El medio sólido así logrado era transparente, lo que permitía visualizar fácilmente los rasgos coloniales, y contenía los nutrientes adecuados para el crecimiento de una amplia gama de bacterias.

Éstas eran inoculadas en la superficie del medio con un hilo de platino pasado previamente por la llama, por la técnica de siembra en estría. Sin embargo, la gelatina presentaba los inconvenientes de ser atacada por determinados microorganismos, y de tener un bajo punto de fusión; ambos problemas se solventaron cuando en 1882 el médico alemán Walter Hesse, siguiendo una sugerencia de su mujer Fanny, introdujo el agar-agar (polisacárido extraído de algas rojas) como nuevo agente solidificante. El trabajo de Koch ya citado tuvo la trascendental consecuencia de derribar las ideas pleomorfitas, y supuso la primera propuesta del concepto de especie dentro del mundo bacteriano. En 1887 Petri, un ayudante de Koch, sustituyó las engorrosas bandejas de vidrio cubiertas con campanas, usadas hasta entonces para los cultivos sólidos, por un sistema manejable de placas de cristal planas, que se conoce como cajas de Petri.

El desarrollo de los medios selectivos y de enriquecimiento fue una consecuencia de las investigaciones llevadas a cabo por Beijerinck y Winogradsky entre 1888 y los primeros años del siglo XX, sobre bacterias implicadas en procesos biogeoquímicos y poseedoras de características fisiológicas distintivas (quimioautótrofas, fijadoras de nitrógeno, etc.). Estos medios, donde se aplica a pequeña escala el principio de selección natural, se diseñan de forma que su composición química definida favorezca sólo el crecimiento de ciertos tipos fisiológicos de microorganismos, únicos capaces de usar ciertos nutrientes del medio.

Otra importante aportación a este "período de cultivo" dentro del desarrollo de la Microbiología surgió del uso de medios diferenciales, en los que se manifiesta algún rasgo bioquímico o metabólico, lo que contribuye a la identificación microbiana. Fue Würtz quien, en 1892, introdujo el uso de indicadores de pH, incorporados en los medios, lo cual permitía revelar la producción de acidificaciones por fermentación en ciertas bacterias.

Mientras tanto, en la ciudad de Jena se había creado una atmósfera de progreso donde confluían grandes naturalistas como Haeckel, Strassburger o Abbé interaccionando con una pujante editorial especializada en Biología y Medicina (Gustav Fischer) y con una poderosa industria óptica y química. Estas influencias recíprocas se plasmaron en numerosos proyectos que reflejaban la efervescencia de las ciencias naturales tras la estela de Darwin (cfr. Jahn *et al.*, 1985). Concretamente, la industria óptica de Abbé y

Zeiss, que se mantenía en conexión con la compañía vidriera Schott, pudo satisfacer la necesidad de Koch de perfeccionar el microscopio compuesto, introduciendo lentes acromáticas y una iluminación inferior provista de condensador. El mismo Abbé desarrolló en 1878 el objetivo de inmersión en aceite. Por otro lado, la industria química BASF, que por aquella época se encontraba en pleno auge de patentes de nuevos colorantes, suministró al laboratorio de Koch una serie de derivados de anilina que teñían las bacterias permitiendo su fácil visualización al microscopio en frotis de tejidos infectados. En 1875 Carl Weigert tiñó bacterias con pirocarmín, un colorante que ya venía siendo usado desde hacía unos años en estudios zoológicos. En años sucesivos se fueron introduciendo el azul de metileno (Koch, 1877), la fuchsina, y el violeta cristal. En 1882-1883 Ziehl y Neelsen desarrollan su método de ácido-alcohol resistencia para teñir *Mycobacterium tuberculosis*. En 1884 el patólogo danés Christian Gram establece una tinción de contraste que permite distinguir dos tipos bacterianos en función de sus reacción diferencial de tinción y que, como se vería mucho más tarde, reflejaba la existencia de dos grupos de bacterias con rasgos estructurales distintivos. En 1890 Loeffler logra visualizar flagelos bacterianos por medio de su técnica de impregnación argéntica. Como veremos más adelante, la misma industria de colorantes alemana previa a la primera guerra mundial fue decisiva también para los comienzos de la quimioterapia.

Estas innovaciones técnicas (métodos de cultivo, microscopía y tinciones) fueron fundamentales (junto con los sistemas de esterilización abordados en el anterior apartado) para la consolidación de la Microbiología como ciencia, permitiendo eliminar las grandes dosis de especulación que hasta entonces habían predominado.

EL PAPEL DE LOS MICROORGANISMOS EN LAS ENFERMEDADES.

Durante el siglo XIX la atención de muchos naturalistas se había dirigido hacia las diversas formas de animales y plantas que vivían como parásitos de otros organismos. Este interés se redobló tras la publicación de los libros de Darwin, estudiándose las numerosas adaptaciones evolutivas que los distintos parásitos habían adquirido en su peculiar estilo de vida. Sin embargo, la adjudicación de propiedades de parásitos a los microorganismos vino del campo médico y veterinario, al revalorizarse las ideas sobre el origen germinal de las enfermedades infecciosas.

En 1835 Agostino Bassi (1773-1856) demostró que cierta enfermedad del gusano de seda (*mal di segno*), que había hecho su aparición en Lombardía, se debía a un hongo (*Botrytis bassiana*). Cuatro años más tarde J.L. Schönlein descubrió la asociación de un hongo con una enfermedad humana de la piel. En 1840 Henle, de la escuela fisiológica de Johannes Müller, planteó la teoría de que las enfermedades infecciosas están causadas por seres vivos invisibles, pero de nuevo la confirmación de estas ideas tuvo que esperar a que la intervención de Pasteur demostrara la existencia de microorganismos específicos responsables de enfermedades.

Hacia mediados del siglo XIX otra enfermedad infecciosa (pebrina) comenzó a diseminarse por los criaderos de gusano de seda de toda Europa, alcanzando finalmente a China y Japón. A instancias de su maestro Jean Baptiste Dumas, Pasteur aceptó el reto de viajar a la Provenza para investigar esta enfermedad que estaba dejando en la ruina a los industriales sederos, a pesar de que nunca hasta entonces se había enfrentado con un problema de patología. Es más que probable que Pasteur viera aquí la oportunidad de confirmar si sus estudios previos sobre las fermentaciones podían tener una extensión hacia los procesos fisiológicos del hombre y de los animales. Es sorprendente que, al principio no se mostrara dispuesto a aceptar la idea de que la pebrina fuera una enfermedad ocasionada por un agente extraño, creyendo durante los dos primeros años que se trataba de alteraciones meramente fisiológicas. Tras una serie de tanteos, y en medio de una intensa actividad intelectual que le obligaba a repasar continuamente los experimentos y las conclusiones extraídas, inmerso en el drama personal de la muerte de su padre y de dos de sus hijas en un corto lapso de tiempo, Pasteur llega finalmente, en 1869, a identificar al protozoo *Nosema bombycis* como el responsable de la epidemia, y por medio de una serie de medidas de control, ésta comienza a remitir de modo espectacular.

La intervención de bacterias como agentes específicos en la producción de enfermedades fue descubierta a raíz de una serie de investigaciones sobre el carbunco o ántrax, enfermedad que afecta al ganado y que puede transmitirse al hombre. C. Davaine, entre 1863 y 1868, encontró que en la sangre de vacas afectadas aparecían grandes cantidades de microorganismos a los que llamó *bacteridios*; además, logró inducir la enfermedad experimentalmente en vacas sanas, inoculándoles muestras de sangre infectada. En 1872 el médico alemán C.J. Eberth consiguió aislar los bacilos filtrando sangre de animales

carbuncosos. Pero fue Robert Koch (1843-1910), que había sido alumno de Henle, quien con su reciente técnica de cultivo puro logró, en 1876, el primer aislamiento y propagación *in vitro* del bacilo del ántrax (*Bacillus anthracis*), consiguiendo las primeras microfotografías sobre preparaciones secas, fijadas y teñidas con azul de metileno. Más tarde (1881), Koch y sus colaboradores confirmaron que las esporas son formas diferenciadas a partir de los bacilos, y más resistentes que éstos a una variedad de agentes. Pero más fundamental fue su demostración de que la enfermedad se podía transmitir sucesivamente a ratones sanos inoculándoles bacilos en cultivo puro, obtenidos tras varias transferencias en medios líquidos.

Este tipo de estrategias para demostrar el origen bacteriano de una enfermedad fue llevado a una ulterior perfección en 1882, con la publicación de "*Die Äthiologie der Tuberkulose*", donde se comunica por primera vez la aplicación de los criterios que Henle había postulado en 1840. Estos criterios, que hoy van asociados al nombre de Koch, son los siguientes:

1. El microorganismo debe de estar presente en todos los individuos enfermos.
2. El microorganismo debe poder aislarse del hospedador y ser crecido en cultivo puro.
3. La inoculación del microorganismo crecido en cultivo puro a animales sanos debe provocar la aparición de síntomas específicos de la enfermedad en cuestión.
4. El microorganismo debe poder ser reaislado del hospedador infectado de forma experimental.

Fue asimismo Koch quien demostró el principio de especificidad biológica del agente infeccioso: cada enfermedad infecciosa específica está causada por un tipo de bacteria diferente. Estos trabajos de Koch abren definitivamente el campo de la Microbiología Médica sobre firmes bases científicas.

Durante las dos décadas siguientes la Microbiología experimentó una auténtica edad de oro, en la que se aislaron y caracterizaron muchas bacterias patógenas. La Alemania del Reich, que a la sazón se había convertido en una potencia política y militar, se decidió a apoyar la continuidad de los trabajos del equipo de Koch, dada su enorme importancia social y económica, creando un Instituto de investigación, siendo Koch su director en el Departamento de Salud. De esta forma, en la Escuela Alemana se aislaron los agentes

productores del cólera asiático (Koch, 1883), de la difteria (Loeffler, 1884), del tétanos (Nicolaiier, 1885 y Kitasato, 1889), de la neumonía (Fraenkel, 1886), de la meningitis (Weichselbaun, 1887), de la peste (Yersin, 1894), de la sífilis (Schaudinn y Hoffman, 1905), etc. Igualmente se pudieron desentrañar los ciclos infectivos de agentes de enfermedades tropicales no bacterianas que la potencia colonial se encontró en ultramar: malaria (Schaudinn, 1901-1903), enfermedad del sueño (Koch, 1906), peste vacuna africana (debida al inglés Bruce, 1895-1897), etc.

Por otro lado, la Escuela Francesa, nucleada en el Instituto Pasteur, se concentró en los estudios sobre los procesos infectivos, la inmunidad del hospedador, y la obtención de vacunas, sobre todo a raíz de la vacuna antirrábica ensayada por Pasteur (1885), contribuyendo al nacimiento de la Inmunología

2.7 DESARROLLO DE LA ASEPSIA, QUIMIOTERAPIA Y ANTIBIOTERAPIA

Los avances de las técnicas quirúrgicas hacia mediados del siglo XIX, impulsados por la introducción de la anestesia, trajeron consigo una gran incidencia de complicaciones post-operatorias derivadas de infecciones. Un joven médico británico, Joseph Lister (1827-1912), que había leído atentamente los trabajos de Pasteur, y que creía que estas infecciones se debían a gérmenes presentes en el aire, comprobó que la aplicación de compuestos como el fenol o el bicloruro de mercurio en el lavado del instrumental quirúrgico, de las manos y de las heridas, disminuía notablemente la frecuencia de infecciones post-quirúrgicas y puerperales.

Más tarde, Paul Ehrlich (1854-1919), que había venido empleando distintas sustancias para teñir células y microorganismos, y que conocía bien el efecto de tinción selectiva de bacterias por ciertos colorantes que dejaban, en cambio, incoloras a células animales, concibió la posibilidad de que algunos de los compuestos de síntesis que la industria química estaba produciendo pudieran actuar como "balas mágicas" que fueran tóxicas para las bacterias pero inocuas para el hospedador. Ehrlich concibió un programa racional de síntesis de sustancias nuevas seguido de ensayo de éstas en infecciones experimentales. Trabajando en el laboratorio de Koch, probó sistemáticamente derivados del atoxilo (un compuesto que ya Thompson, en 1905, había mostrado como eficaz

contra la tripanosomiasis), y en 1909 informó de que el compuesto 606 (salvarsán) era efectivo contra la sífilis. Aunque el salvarsán presentaba algunos efectos colaterales, fue durante mucho tiempo el único agente disponible contra enfermedades producidas por espiroquetas, y sirvió para ilustrar brillantemente la validez del enfoque de la llamada quimioterapia (término acuñado por el mismo Ehrlich), de modo que encauzó toda la investigación posterior.

En 1927 Gerhard Domagk, en conexión con la poderosa compañía química I.G. Farbenindustrie, inició un ambicioso proyecto de búsqueda de nuevos agentes quimioterápicos, siguiendo el esquema de Ehrlich; en 1932-1935 descubre la acción del rojo de prontosilo frente a neumococos hemolíticos dentro del hospedador, pero señala que esta droga es inactiva sobre bacterias creciendo *in vitro*. La explicación la suministra el matrimonio Tréfouël, del Instituto Pasteur, al descubrir que la actividad antibacteriana depende de la conversión por el hospedador en sulfanilamida. El mecanismo de acción de las sulfamidas (inhibición competitiva con el ácido para-aminobenzoico) fue dilucidado por el estadounidense Donald D. Woods. Las investigaciones de éste encaminaron a la industria farmacéutica hacia la síntesis de análogos de metabolitos esenciales, introduciendo un enfoque más racional frente a la época anterior, más empírica.

En 1874, el médico inglés W. Roberts había descrito las propiedades antibióticas de ciertos cultivos de hongos (*Penicillium glaucum*) contra las bacterias, e introdujo en Microbiología el concepto de antagonismo. Otros investigadores de finales del siglo XIX realizaron observaciones similares, pero fue Fleming quien, en 1929, logró expresar ideas claras sobre el tema, al atribuir a una sustancia química concreta (la penicilina) la acción inhibidora sobre bacterias producida por el hongo *Penicillium notatum*. Fleming desarrolló un ensayo crudo para determinar la potencia de la sustancia en sus filtrados, pudiendo seguir su producción a lo largo del tiempo de cultivo, y mostrando que no todas las especies bacterianas eran igualmente sensibles a la penicilina. Las dificultades técnicas para su extracción, junto al hecho de que el interés de la época aún estaba centrado sobre las sulfamidas, impidieron una pronta purificación de la penicilina, que no llegó hasta los trabajos de Chain y Florey (1940), comprobándose entonces su gran efectividad contra infecciones bacterianas, sobre todo de Gram-positivas, y la ausencia de efectos tóxicos para el hospedador.

Inmediatamente comenzó una búsqueda sistemática de microorganismos del suelo que mostraran actividades antibióticas. En 1944 A. Schatz y S. Waksman descubren la estreptomicina, producida por *Streptomyces griseus*, siendo el primer ejemplo de **antibiótico** de amplio espectro. Los diez años que siguieron al término de la segunda guerra mundial vieron la descripción de 96 antibióticos distintos producidos por 57 especies de microorganismos, principalmente Actinomicetos.

En la década de los 60 se abrió una nueva fase en la era de los antibióticos al obtenerse compuestos semisintéticos por modificación química de antibióticos naturales, paliándose los problemas de resistencia bacteriana a drogas que habían empezado a aparecer, disminuyéndose en muchos casos los efectos secundarios, y ampliándose el espectro de acción.

Aparte de la revolución que supusieron en el campo de la aplicación clínica, los antibióticos han permitido notables avances en el desentrañamiento de determinados aspectos de arquitectura y función moleculares de las células susceptibles (paredes celulares microbianas, ribosomas, síntesis proteica, etc.).

2.8 AUGA DE LA MICROBIOLOGÍA GENERAL.

Gran parte de los avances en Microbiología descritos hasta ahora se debieron a la necesidad de resolver problemas prácticos. Pero hacia finales del siglo XIX una serie de investigadores -algunos de ellos procedentes de áreas más clásicas de la Historia Natural- desarrollaron importantes estudios básicos que fueron revelando una enorme variedad de microorganismos y sus actividades metabólicas, así como su papel crucial en ciclos biogeoquímicos, sus relaciones con procesos de nutrición vegetal, etc.

El descubrimiento de la quimioautotrofia, obra del gran microbiólogo ruso Sergei Winogradsky (1856-1953), obligó a revisar los conceptos previos, procedentes de la Fisiología Vegetal, de que el crecimiento autotrófico dependía de la presencia de clorofila. Winogradsky había comenzado investigando las bacterias del hierro descubiertas por Cohn en 1875, observando que podían crecer en medios minerales, por lo que supuso que obtenían su energía de la oxidación de sales ferrosas a férricas (1888). En 1889,

combinando técnicas de observación secuencial de cultivos microscópicos con ensayos microquímicos sobre bacterias del azufre (*Beggiatoa*, *Thiothrix*), infirió que estos microorganismos oxidaban sulfuro de hidrógeno hasta azufre elemental (acumulando éste como gránulos), y luego hasta ácido sulfúrico, obteniendo de este modo su energía. Estas observaciones pueden haber sido el arranque del concepto de litotrofia. Pero el descubrimiento de la quimioautotrofia llegó cuando al año siguiente Winogradsky y Omeliansky pasaron a estudiar las bacterias nitrificantes, demostrando de manera clara que la energía obtenida de la oxidación del amonio o del nitrito era usada para fijar CO_2 (1889-1890). Más tarde el mismo Winogradsky extendió la demostración a cultivos puros en los que el agente solidificante de los medios era el gel de sílice. La explicación del proceso de oxidación de los compuestos de azufre no llegó hasta los estudios de Dangeard (1911) y Kiel (1912). Nuevas capacidades metabólicas fueron reveladas al estudiar los procesos respiratorios de las bacterias que oxidan hidrógeno o metano (Söhngen, 1906).

El químico Berthelot había señalado (1885) que los microorganismos del suelo podían incorporar nitrógeno molecular directamente del aire. Fue igualmente Winogradsky el primero en aislar una bacteria capaz de fijar nitrógeno atmosférico (*Clostridium pasteurianum*) y en explicar el ciclo del nitrógeno en la naturaleza (1890), siendo el holandés Martinus Beijerinck (1851-1931) el descubridor de *Azotobacter* como bacteria aerobia fijadora de vida libre (1901). Más tarde Beijerinck demostró por métodos químicos que, en efecto, *Azotobacter* incorpora nitrógeno de la atmósfera mientras crece (1908). La importancia de la fijación de nitrógeno para la nutrición vegetal llegó con los estudios sobre bacterias formadoras de nódulos en las raíces de las leguminosas. Ya los experimentos cuantitativos sobre plantas creciendo en recipientes, realizados por Boussingault a mediados del siglo XIX, habían indicado que las leguminosas asimilaban nitrógeno de la atmósfera. En 1866 Voronin descubrió las bacterias de los nódulos radicales de esta familia de plantas. Frank, en 1879, demostró que los nódulos parecían inducirse por las mismas bacterias albergadas en ellos, y Ward (1887) usó bacterias procedentes de nódulos machacados para inocular semillas, logrando la producción de nódulos en suelo estéril, y describiendo en un bello trabajo el proceso de infección, con su producción de "hifas" (cordón de infección). Tras la introducción del concepto de simbiosis por De Bary, en 1878, fue Schindler (1884) el primero en describir los nódulos radicales como resultado de una simbiosis entre planta y bacterias. Los trabajos de

Hermann Hellriegel (1831-1895) y de su colaborador Hermann Willfahrt (1853-1904), que trabajaban en la Estación Experimental de Bernburg, comunicados en primer lugar en un congreso en Berlín, en 1886, y publicados en un artículo ejemplar en 1888, asociaron la fertilidad nitrogenada natural de las leguminosas con la presencia de sus nódulos radicales, señalando que estos nódulos se inducían por microorganismos específicos; de este modo lograron una brillante síntesis de las observaciones microbiológicas y químicas. El mismo año de 1888 Beijerinck logró el cultivo puro *in vitro* de las bacterias nodulares (a las que bautizó como *Bacillus radicicola*), observando que no reducían nitrógeno en vida libre; más tarde (1890) aportó la prueba definitiva de que las bacterias aisladas eran capaces de nodular específicamente ciertas especies de leguminosas, adquiriéndose de esta forma la facultad de fijar nitrógeno en su asociación con la raíz de la planta. Irónicamente el nombre definitivo para las bacterias de los nódulos de leguminosas (*Rhizobium*) fue propuesto por Frank, quien durante mucho tiempo se había negado a reconocer los resultados de Hellriegel y Willfahrt, y que había oscilado en sus opiniones, desde suponer que la fijación de nitrógeno era un rasgo general de las plantas, hasta creer que las estructuras nodulares observadas a microscopio (bacteroides) eran gránulos de reserva (incluidas las que él mismo observó en plantas no leguminosas de los géneros *Alnus* y *Eleagnus*, originadas por una bacteria bautizada en su honor -*Frankia*); incluso cuando se convenció de que los simbiontes eran bacterias (y no hongos o mixomicetes), pensaba que éstas sólo estimulaban a que las plantas fijaran nitrógeno en sus hojas; su "conversión" (y aun así incompleta y con reticencias) no llegó hasta 1892. El aislamiento de los bacteroides intranodulares (Prazmowski, 1890), y la relación entre su formación y la fijación de nitrógeno (Nobbe y Hiltner, 1893) completó esta primera oleada de investigación sobre este tema que tanta trascendencia presentaba para la Agronomía. Estos estudios están en la base de todos los posteriores trabajos de Microbiología Agrícola, de modo que esta especialidad fue incorporada tempranamente a los laboratorios científicos y estaciones experimentales.

Las obras trascendentales de Winogradsky y Beijerinck abrieron un nuevo horizonte para el estudio de la diversidad microbiana. La escuela de Beijerinck, en la Universidad Técnica de Delft, fue continuada por A.J. Kluver y C.B. van Niel, siendo este último el "padre" de la escuela norteamericana desde su establecimiento en California, ya que formó a figuras tan importantes como R.Y. Stanier, R.E. Hungate o M. Doudoroff. La escuela holandesa fundada por Beijerinck tuvo asimismo otra fructífera "colonia" en la ciudad alemana de

Konstanz, donde N. Pfennig continuó el trabajo emprendido junto a van Niel en Delft. Todos estos autores, y sus colaboradores, fueron realizando contribuciones esenciales sobre una amplia diversidad de bacterias, descubriendo la variedad de las bacterias fotosintéticas, los tipos de organismos litotróficos, y profundizando en multitud de aspectos estructurales y fisiológicos de las bacterias recién descubiertas. Como dice T.D. Brock en una reseña de Kluver (1961) "los hombres de la escuela de Delft de Microbiología General fueron pioneros en una época en la que la mayoría de los investigadores estaban demasiado fascinados por problemas aplicados en medicina, agricultura o industria, como para preocuparse por microorganismos quimiosintéticos o fotosintéticos, o por aquellos que muestran fermentaciones inusuales...". Pero, como en tantas otras ocasiones, este enfoque de ciencia básica ha sido extraordinariamente fértil, y aparte de la profundización en la unidad y diversidad de la vida ha dado origen a penetrantes percepciones en multitud de problemas planteados, tarde o temprano, a las ciencias biológicas.

DESARROLLO DE LA INMUNOLOGÍA

La inmunología es, en la actualidad, una ciencia autónoma y madura, pero sus orígenes han estado estrechamente ligados a la Microbiología. Su objeto consiste en el estudio de las respuestas de defensa que han desarrollado los animales frente a la invasión por microorganismos o partículas extrañas, aunque su interés se ha volcado especialmente sobre aquellos mecanismos altamente evolucionados e integrados, dotados de especificidad y de memoria, frente a agentes reconocidos por el cuerpo como no-propios, así como de su neutralización y degradación.

Como tantas otras ciencias, la Inmunología presenta un prolongado período pre-científico, de observaciones y aproximaciones meramente empíricas. La resistencia a posteriores ataques de una enfermedad infecciosa fue ya recogida en escritos de la antigüedad; el historiador griego Tucídides (464-404 a.C.) narra que en una epidemia acaecida durante la guerra del Peloponeso, los enfermos eran atendidos solo por aquellos que habían sobrevivido previamente a la enfermedad, en la seguridad de que éstos no volverían a ser contagiados. Igualmente, en la antigua China se había observado que las personas que en su niñez habían padecido la viruela no la adquirirían más adelante en su vida. Los mismos chinos, en el siglo XI a. C., fueron los primeros en intentar una

aplicación de estas observaciones que indicaban la inducción de un estado protector por medio de una forma suave de la enfermedad: la inhalación de polvo de escaras de viruela provocaba un ataque suave que confería resistencia ante infecciones posteriores. Una modificación fue introducida en Occidente en el siglo XVIII por Pylarini y Timoni, y fue popularizada en Gran Bretaña por Lady Mary Wortley Montagu, esposa del embajador inglés en Constantinopla, tras una serie inicial de pruebas sobre "voluntarios" (prisioneros). Sin embargo, este tipo de prácticas no llegaron a arraigar ampliamente, ya que no estaban exentas de riesgos, entre los cuales figuraba la posibilidad de transmisión de otras enfermedades.

El primer acercamiento a la inmunización con criterios racionales fue realizado por el médico inglés **Edward Jenner** (1749-1823), tras su constatación de que los vaqueros que habían adquirido la viruela vacunal (una forma benigna de enfermedad que sólo producía pústulas en las manos) no eran atacados por la grave y deformante viruela humana. En mayo de 1796 inoculó a un niño fluido procedente de las pústulas vacunales de Sarah Nelmes; semanas después el niño fue inyectado con pus de una pústula de un enfermo de viruela, comprobando que no quedaba afectado por la enfermedad. Jenner publicó sus resultados en 1798 ("*An enquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae...*"), pronosticando que la aplicación de su método podría llegar a erradicar la viruela. Jenner fue el primero en recalcar la importancia de realizar estudios clínicos de seguimiento de los pacientes inmunizados, consciente de la necesidad de contar con controles fiables.

La falta de conocimiento, en aquella época, de las bases microbiológicas de las enfermedades infecciosas retrasó en casi un siglo la continuación de los estudios de Jenner, aunque ciertos autores, como Turenne, en su libro "La syphilization" (1878) lograron articular propuestas teóricas de cierto interés.

El primer abordaje plenamente científico de problemas inmunológicos se debió, de nuevo, a Pasteur. Estudiando la bacteria responsable del cólera aviar (más tarde conocida como *Pasteurella aviseptica*), observó (1880) que la inoculación en gallinas de cultivos viejos, poco virulentos, las protegía de contraer la enfermedad cuando posteriormente eran inyectadas con cultivos normales virulentos. De esta forma se obtuvo la primera vacuna a base de microorganismos atenuados. Fue precisamente Pasteur quien

dio carta de naturaleza al término vacuna, en honor del trabajo pionero de Jenner. En los años siguientes Pasteur abordó la inmunización artificial para otras enfermedades; concretamente, estableció de forma clara que cultivos de *Bacillus anthracis* atenuados por incubación a 45°C conferían inmunidad a ovejas expuestas a contagio por carbunco. Una famosa demostración pública de la bondad del método de Pasteur tuvo lugar en Pouilly le Fort, el dos de junio de 1881, cuando ante un gentío expectante se pudo comprobar la muerte del grupo control de ovejas y vacas no inoculadas, frente a la supervivencia de los animales vacunados. Años después, abordaría la inmunización contra la rabia, enfermedad de la que se desconocía el agente causal. Pasteur observó que éste perdía virulencia cuando se mantenían al aire durante cierto tiempo extractos medulares de animales infectados, por lo que dichos extractos se podían emplear eficazmente como vacunas. Realizó la primera vacunación antirrábica en humanos el 6 de julio de 1885, sobre el niño Joseph Meister, que había sido mordido gravemente por un perro rabioso. A este caso siguieron otros muchos, lo que valió a Pasteur reconocimiento universal y supuso el apoyo definitivo a su método de inmunización, que abría perspectivas prometedoras de **profilaxis** ante muchas enfermedades. Estos logros determinaron, en buena medida, la creación del Instituto Pasteur, que muy pronto reunió a un selecto grupo de científicos, que enfocarían sus esfuerzos en diversos aspectos de las inmunizaciones y de sus bases biológicas. A su vez, los norteamericanos Salmon y Smith (1886) perfeccionaron los métodos serológicos de Pasteur, lo que les permitió producir y conservar más fácilmente sueros tipificados contra la peste porcina.

A finales del siglo XIX existían dos teorías opuestas sobre los fundamentos biológicos de las respuestas inmunes. Por un lado, el zoólogo ruso Ilya Ilich Mechnikov (1845-1916), que había realizado observaciones sobre la fagocitosis en estrellas de mar y pulgas de agua, estableció, a partir de 1883, su "Teoría de los fagocitos", tras estudiar fenómenos de englobamiento de partículas extrañas por los leucocitos de conejo y de humanos. Informó que existían fenómenos de eliminación de agentes patógenos por medio de "células devoradoras" (fagocitos) que actuaban en animales vacunados contra el carbunco, y explicó la inmunización como una "habitación" del hospedador a la fagocitosis. Más tarde, ya integrado en el Instituto Pasteur, propugnó la idea de que los fagocitos segregan enzimas específicos, análogos a los "fermentos" digestivos (1900). Esta teoría de los fagocitos constituyó el núcleo de la teoría de la inmunidad celular, de modo que la

fagocitosis se consideraba como la base principal del sistema de defensa inmune del organismo.

Por otro lado, la escuela alemana de Koch hacía hincapié en la importancia de los mecanismos humorales. Emil von Behring (1854-1917) y Shibasaburo Kitasato (1856-1931), a resultas de sus trabajos sobre las toxinas del tétanos y de la difteria, observaron que el cuerpo produce "antitoxinas" (más tarde conocidas como **anticuerpos**) que tendían a neutralizar las toxinas de forma específica, y evidenciaron que el suero que contiene antitoxinas es capaz de proteger a animales expuestos a una dosis letal de la toxina correspondiente (1890). La intervención de Ehrlich permitió obtener sueros de caballo con niveles de anticuerpos suficientemente altos como para conferir una protección eficaz, e igualmente se pudo disponer de un ensayo para cuantificar la "antitoxina" presente en suero. Ehrlich dirigió desde 1896 el Instituto Estatal para la Investigación y Comprobación de Sueros, en Steglitz, cerca de Berlín, y, a partir de 1899, estuvo al frente del mejor equipado Instituto de Terapia Experimental, en Frankfurt. Durante este último periodo de su vida, Ehrlich produce una impresionante obra científica, en la que va ahondando en la comprensión de la inmunidad humoral. En 1900 da a luz su "Teoría de las cadenas laterales", en la que formula una explicación de la formación y especificidad de los anticuerpos, estableciendo una base química para la interacción de éstos con los antígenos. Por su lado, R. Kraus visualiza por primera vez, en 1897, una reacción antígeno-anticuerpo, al observar el enturbiamiento de un filtrado bacteriano al mezclarlo con un suero inmune específico (antisuero). En 1898 Jules Bordet (1870-1961) descubre otro componente sérico relacionado con la respuesta inmunitaria, al que bautiza como "alexina", caracterizado, frente al anticuerpo, por su termolabilidad e inespecificidad. (Más tarde se impondría el nombre de complemento, propuesto por Ehrlich). El mismo Bordet desarrolló, en 1901, el primer sistema diagnóstico para la detección de anticuerpos, basado en la fijación del complemento, y que inició una larga andadura, que llega a nuestros días.

La conciliación de las dos teorías se debió a Almorph Wrigth y Stewart R. Douglas, quienes en 1904 descubren las opsoninas, anticuerpos presentes en los sueros de animales inmunizados y que, tras unirse a la superficie bacteriana, incrementan la capacidad fagocítica de los leucocitos.

El área de la inmunopatología inicia su andadura con la descripción del fenómeno de anafilaxia producido por introducción en un animal de un suero de una especie distinta (Portier y Richet, 1902; Arthus, 1903), lo que a su vez abriría la posibilidad de métodos de serodiagnóstico, con aplicaciones múltiples en Medicina, Zoología, y otras ciencias biológicas. En 1905 Pirquet sugiere que la enfermedad del suero (un fenómeno de hipersensibilidad) tiene relación directa con la producción de anticuerpos contra el suero inyectado, introduciendo el término de alergia para referirse a la reactividad inmunológica alterada.

La inmunoquímica cobra un gran impulso en las primeras décadas del siglo XX con los trabajos de Karl Landsteiner (1868-1943). Su primera contribución de importancia había sido la descripción, mediante reacciones de aglutinación, del sistema de antígenos naturales (ABC0) de los eritrocitos humanos (1901-1902), completada (en colaboración con Von Dungern y Hirzfeld), con las subdivisiones del grupo A y el estudio de su transmisión hereditaria. Estos trabajos sirvieron de estímulo para avanzar en el desentrañamiento de la especificidad química de los antígenos que determinan la formación de anticuerpos. Landsteiner estudió sistemáticamente las características de inmunogenicidad y especificidad de reacción de antígenos con anticuerpos, valiéndose de la modificación química de antígenos, denominando haptenos a aquellos grupos químicos que por sí mismos no desencadenan formación de anticuerpos, pero sí lo hacen tras ser conjugados a proteínas portadoras.

La cuestión de las reacciones antígeno-anticuerpo se convirtió en otra polémica entre escuelas hasta finales de los años 20. Mientras Ehrlich y sus seguidores mantenían que estas reacciones tienen una base puramente química, Bordet y sus discípulos las explicaban como fenómenos físicos de reacciones entre coloides. La resolución del debate debió aguardar hasta finales de los años 30, al incorporarse avances técnicos como la electroforesis, la cromatografía en papel, la ultracentrifugación y el microscopio electrónico. Heidelberg y Kendall (1936) purificaron anticuerpos a partir de sueros por disociación de precipitados. Tiselius (1939) demostró que los anticuerpos constituyen la fracción gamma-globulínica del suero. Veinte años después R.R. Porter y G.M. Edelman establecen la estructura de las inmunoglobulinas. Durante este lapso de tiempo se descubre que la síntesis de anticuerpos ocurre en las células plasmáticas, aunque éstas no son puestas en relación aún con los linfocitos; durante muchos años se siguió creyendo

que los linfocitos eran células pasivas, sin función inmune. Por aquella época se describe, también, la diversidad de inmunoglobulinas, llegándose al establecimiento de una nomenclatura. Enseguida comienza la era de los múltiples experimentos sobre timectomía en ratones neonatos y sobre bursectomía en aves, así como los de reconstitución de animales irradiados, con timocitos y células de la médula ósea, y que permiten afirmar el papel esencial de los linfocitos, encuadrarlos en tipos funcionales T y B, y relacionarlos con las respuestas inmunes celular y humoral, respectivamente.

Una importante faceta de la inmunología de la primera mitad del siglo XX fue la obtención de vacunas. Se lograron toxoides inmunogénicos a partir de toxinas bacterianas, en muchos casos por tratamiento con formol: toxoide tetánico (Eisler y Lowenstein, 1915) y toxoide diftérico (Glenny, 1921). En 1922 se desarrolla la vacuna BCG contra la tuberculosis, haciendo uso de una cepa atenuada de *Mycobacterium tuberculosis*, el bacilo de Calmette-Guérin. La utilización de coadyuvantes se inicia en 1916, por LeMoignic y Piroy.

La inmunogenética nace cuando Bernstein describe en 1921 el modelo de transmisión hereditaria de los cuatro grupos sanguíneos principales, basándose en el análisis estadístico de sus proporciones relativas, y con el descubrimiento por Landsteiner y Levène (1927) de los nuevos sistemas MN y P. Los experimentos de transfusiones sanguíneas interespecíficas permitieron distinguir la gran complejidad de los antígenos sanguíneos, explicables según unos 300 alelos múltiples.

Una contribución esencial a las ideas sobre el mecanismo de formación de los anticuerpos la realizó el australiano Macfarlane Burnet (1899-1985), al establecer su teoría de la selección clonal; ésta argumenta que cada linfocito B sintetiza un único tipo de anticuerpo, específico para cada antígeno (determinante antigénico), de modo que la unión del antígeno causa la proliferación clonal del linfocito B, con la consecuente síntesis incrementada de anticuerpos específicos. Igualmente, Burnet lanzó una hipótesis sobre el mecanismo subyacente a la auto-tolerancia inmunológica, que fue confirmada experimentalmente por Peter Medawar. Más recientemente Niels Jerne ha realizado nuevas aportaciones y refinamientos a la teoría de la selección clonal, proponiendo un modelo de regulación inmune conocido como teoría de las redes idiotípicas.

Los avances en Inmunología durante los últimos años han sido espectaculares, consolidando a ésta como ciencia independiente, con su conjunto propio de paradigmas, ya relativamente escindida de su tronco originario microbiológico. Entre los hitos recientes hay que citar la técnica de producción de anticuerpos monoclonales a partir de hibridomas, desarrollada originalmente por César Milstein y Georges Kohler en 1975, y que presenta una enorme gama de aplicaciones en biomedicina, o el desentrañamiento de los fenómenos de reorganización genética responsables de la expresión de los genes de inmunoglobulinas, por Susumu Tonegawa.

ORIGEN Y DESARROLLO DE LA VIROLOGÍA

La Virología ha sido la ciencia microbiológica de origen más tardío, habiendo surgido como resultado del hallazgo de enfermedades infecciosas en las que la demostración de implicación de microorganismos se demostraba esquiva con los medios habituales disponibles a finales del siglo XIX. La euforia que se vivía en los ámbitos científicos y médicos, al socaire de la edad de oro de aislamiento de bacterias patógenas, se plasmó en el prejuicio de que la incapacidad de hacer crecer los agentes causantes de ciertas enfermedades se debía a una técnica inapropiada o mal aplicada.

El botánico ruso Dimitri Iwanovski había observado (1892) que la enfermedad del mosaico del tabaco podía ser reproducida experimentalmente usando el fluido que atravesaba los filtros de porcelana que normalmente retenían a las bacterias, pero siendo incapaz de aislar y crecer el supuesto microorganismo, abandonó la investigación. Pocos años más tarde (1898), y probablemente sin tener noticias del trabajo de Iwanovski, Beijerinck realizó experimentos similares con el mismo sistema, y en otro rasgo de su genio, enfrentándose a los conceptos de la época, avanzó la idea de que el agente filtrable (un *contagium vivum fluidum*, según su expresión), debía de incorporarse al protoplasma vivo del hospedador para lograr su reproducción. Este tipo de agentes infectivos que atravesaban los filtros de porcelana fueron llamados en principio "virus filtrables", quedando más tarde su denominación simplemente como *virus*. Aquel mismo año de 1898 Loeffler y Frosch descubren los virus animales al comprobar que un virus filtrable es responsable de la glosopeda del ganado. En 1901 Reed descubre el primer virus humano, el de la fiebre amarilla, y en 1909 Landsteiner y Pope detectan el de la poliomielitis. A

comienzos de siglo Copeman desarrolla su técnica de multiplicación de virus animales en embriones de pollo, con la que P. Rous aísla y cultiva el virus del sarcoma aviar (1911).

Los virus bacterianos fueron descubiertos en 1915 por F.W. Twort, si bien su trabajo no alcanzó la elegancia y claridad del desarrollado poco más tarde por el canadiense Félix d'Hérelle (1917); fue éste quien acuñó el término *bacteriófago*, y supuso correctamente que el fenómeno de lisis por estos agentes debía de estar ampliamente difundido entre las bacterias. Aunque su esperanza en la aplicación de los fagos como elementos bactericidas para uso médico no pudo satisfacerse, la contribución de los virus bacterianos al avance de la genética y biología moleculares ha sido decisiva: de hecho, los primeros estudios cuantitativos sobre replicación virásica se realizaron sobre fagos de *Escherichia coli*, lo que suministró modelos aplicables a otros virus, incluidos los de animales. En 1925 Bordet y Bal describen por primera vez el fenómeno de lisogenia, pero las relaciones entre los ciclos lítico y lisogénico de los fagos no fueron aclaradas hasta los estudios de André Lwoff (1950).

La primera visualización de un virus se debe a las observaciones a microscopio ultravioleta del bacteriólogo inglés Barnard (1925), y en 1939 se realiza la primera fotografía de un virus a microscopio electrónico. Pero los avances más significativos en el estudio de la composición y estructura de los virus se inician con la purificación y cristalización, por Wendell M. Stanley, del virus del mosaico del tabaco -TMV- (1935), aplicando procedimientos típicos de la cristalización de enzimas. Inicialmente Stanley comprobó que el TMV contenía gran proporción de proteína, pero poco más tarde detecta, además, la presencia de ácido nucleico. A partir de aquí, la Virología entra en una fase de ciencia cuantitativa, en la que participan numerosos físicos, bioquímicos y genetistas, en un esfuerzo interdisciplinar que da origen a la moderna Biología Molecular.

Un importante avance metodológico para el estudio de los virus animales se debió a Enders, Weller y Robbins (1949), al desarrollar por primera vez un método para la multiplicación virásica sobre cultivos de tejidos de mamíferos, técnica que fue perfeccionada más tarde por el equipo de Renato Dulbecco.

Los recientes progresos en las numerosas técnicas de biología molecular han propiciado una auténtica explosión de descubrimientos sobre la biología de los virus y de sus células hospedadoras; baste citar la replicación del genoma de ARN de los retrovirus por

reversotranscripción a ADN, los fenómenos de transformación oncogénica virásica y su aplicación a los estudios generales del cáncer, el diseño de vacunas recombinantes por manipulación *in vitro* de genomas virásicos, la próxima aplicación clínica de las primeras terapias génicas en humanos recurriendo a vectores virásicos, etc. En el terreno de las necesidades urgentes, la metodología existente ha permitido la rápida identificación y caracterización del virus de la inmunodeficiencia humana, lo que se está traduciendo en una intensa y racional búsqueda de procedimientos para prevenir y eliminar la inesperada epidemia de SIDA.

En años recientes han sido descubiertos dos nuevos tipos de entidades infectivas, subvirásicas: T.O. Diener describió en 1967 la existencia de ARN desnudos infectivos en plantas, a los que llamó *viroides*, y en 1981 Prusiner puso de manifiesto que determinadas enfermedades de mamíferos se deben a partículas proteicas aparentemente desprovistas de material genético, a las que bautizó como *priones*.

RELACIONES ENTRE LA MICROBIOLOGÍA Y OTRAS CIENCIAS BIOLÓGICAS.

El auge de la microbiología desde finales del siglo XIX se plasmó, entre otras cosas, en el aislamiento de gran variedad de cepas silvestres de microorganismos, lo que suministró un enorme volumen de nuevo material biológico sobre el que trabajar, aplicándose una serie de enfoques que eran ya habituales en las ciencias naturales más antiguas; así, había que crear un marco taxonómico (con sus normas de nomenclatura) para encuadrar a los organismos recién descubiertos, era factible desarrollar trabajos sobre morfología y fisiología comparadas, sobre variabilidad y herencia, evolución, ecología, etc. De este modo la joven Microbiología fue objeto, en pocos años, de la utilización, a un ritmo acelerado, de los métodos taxonómicos y experimentales que habían ido surgiendo y madurando desde el siglo XVIII en los ámbitos de la "Historia Natural" clásica.

Aunque nos referiremos en otro apartado a los avances de Taxonomía Microbiana, vale la pena reseñar aquí los esfuerzos tempranos para lograr una clasificación bacteriana por parte de Cohn (1875) y Migula (1894), que sustentaban su concepto de especie predominantemente sobre caracteres morfológicos. Pero hacia 1900 era evidente la arbitrariedad e insuficiencia de este tipo de clasificaciones, de modo que los intentos posteriores hicieron uso de caracteres bioquímicos (Orma Jensen, 1909), o de una mezcla de rasgos morfológicos, bioquímicos, patogénicos y de tinción (Buchanan, 1915).

El sistema de taxonomía bacteriana adquirió un nuevo impulso a partir de la 1ª edición del "*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*" (1923), y de las propuestas de Kluyver y van Niel ("*Prospects for a natural system of classification of bacteria*", 1936). En cuanto a la nomenclatura, no fue hasta 1958 en que cuajó un Código Internacional de Nomenclatura Bacteriológica, aunque ya se venía aplicando desde hacía tiempo el procedimiento tipológico para los microorganismos, con criterios similares a los de la Zoología y la Botánica.

El establecimiento de relaciones taxonómicas precisó el recurso a métodos cada vez más amplios y afinados de análisis genético, estructural o fisiológico. En un apartado anterior ya vimos las conexiones tempranas entre la Bioquímica y la Microbiología a propósito del descubrimiento de la base enzimática de las fermentaciones, lo cual abrió el camino para dilucidar el metabolismo energético microbiano, y para demostrar su similitud química con rutas metabólicas de organismos superiores. Otro paso importante en la percepción de la unidad bioquímica del mundo vivo deriva del descubrimiento de las vitaminas (término acuñado por Funk en 1911), al establecerse que determinados factores de crecimiento requeridos por algunos microorganismos eran químicamente similares a las vitaminas necesarias en la dieta de los animales, y que este tipo de compuestos representa precursores biosintéticos de coenzimas del metabolismo celular. Así pues, este tipo de investigaciones sentó claramente la idea de la unidad química de los seres vivos, independientemente de su encuadre taxonómico, y encauzó una buena parte de los trabajos bioquímicos hacia los microorganismos, dadas sus cualidades de facilidad de manejo y cultivo en laboratorio.

En cuanto a las conexiones de la Microbiología con la Genética, ya Beijerinck, en 1900, tras analizar la teoría de la mutación de De Vries, había predicho que los microorganismos podrían convertirse en objetos de investigación más adecuados que los sistemas animales o vegetales. Pero las primeras conexiones entre ambas ciencias arrancan de la necesidad que hubo, a principios del siglo XX, de determinar la sexualidad de los hongos con fines taxonómicos. En 1905 Maire demostró la existencia de meiosis en la formación de ascosporas, y Claussen (1907) evidenció fusión de núcleos en Ascomicetos, mientras que Kniepp, hacia finales de los años 30 había recogido un gran volumen de información sobre procesos sexuales en Basidiomicetos. El sueco Lindegren (1936) realiza las primeras cartografías genéticas en cromosomas de *Neurospora*, durante su estancia en el

laboratorio californiano de Morgan; este último, propugnador de la "teoría de los genes" (1926), confiaba desde hacía años en ampliar sus éxitos, logrados en *Drosophila*, hacia el estudio de la genética microbiana. En 1941, otros dos discípulos de Morgan, Beadle y Tatum, aislan mutantes auxotróficos de *Neurospora*, con lo que se inicia el estudio de la base bioquímica de la herencia, y convierten a este hongo en una valiosa herramienta de trabajo en esta línea de investigación.

Las estrategias diseñadas por Beadle y Tatum fueron aplicadas por Luria y Delbrück (1943) a cultivos bacterianos, investigando la aparición de mutaciones espontáneas resistentes a fagos o estreptomina. La conexión de estos experimentos con las observaciones previas de Griffith (1928) sobre la transformación del neumococo, llevó a Avery y colaboradores (1944) a demostrar que el "principio transformante" portador de la información genética es el ADN. En 1949 Erwin Chargaff demuestra bioquímicamente la transmisión genética mediante ADN en *Escherichia coli*, y en 1952 Alfred Hershey y Martha Chase, en experimentos con componentes marcados de fagos, ponen un elegante colofón a la confirmación de la función del ADN, con lo que se derribaba el antiguo y asentado "paradigma de las proteínas" que hasta mediados de siglo intentaba explicar la base de la herencia. De esta forma, la Microbiología experimental se sitúa en pleno centro del nacimiento de la Genética molecular, de la mano de los avances paralelos en Bioquímica (análisis por rayos X de la estructura del ADN debido a Maurice Wilkins y Rosalind Franklin, modelo de Watson y Crick de la doble hélice del ADN, etc.), dando origen esta confluencia a lo que se ha llamado la "edad de oro" de la Biología Molecular.

OBJETO DE ESTUDIO DE LA MICROBIOLOGÍA

El objeto de estudio de una ciencia se puede desglosar en dos apartados: objeto material y objeto formal.

1.3 Tipos de microorganismos

OBJETO MATERIAL: LOS MICROORGANISMOS

La Microbiología es la ciencia que se ocupa del estudio de los microorganismos, es decir, de aquellos organismos demasiado pequeños para poder ser observados a simple vista, y cuya visualización requiere el empleo del microscopio. Esta definición implica que el objeto material de la Microbiología viene delimitado por el tamaño de los seres que

investiga, lo que supone que abarca una enorme heterogeneidad de tipos estructurales, funcionales y taxonómicos: desde partículas no celulares como los virus, viroides y priones, hasta organismos celulares tan diferentes como las bacterias, los protozoos y parte de las algas y de los hongos. De esta manera la Microbiología se distingue de otras disciplinas organísmicas (como la Zoología y la Botánica) que se centran en grupos de seres vivos definidos por conceptos biológicos homogéneos, ya que su objeto de indagación se asienta sobre un criterio artificial que obliga a incluir entidades sin más relación en común que su pequeño tamaño, y a excluir a diversos organismos macroscópicos muy emparentados con otros microscópicos.

A pesar de esto (o incluso debido a ello), la Microbiología permanece como una disciplina perfectamente asentada y diferenciada, que deriva su coherencia interna del tipo de metodologías ajustadas al estudio de los organismos cuyo tamaño se sitúa por debajo del límite de resolución del ojo humano, aportando un conjunto específico de conceptos que han enriquecido la moderna Biología.

Podemos definir, pues, a los microorganismos como seres de tamaño microscópico dotados de individualidad, con una organización biológica sencilla, bien sea acelular o celular, y en este último caso pudiendo presentarse como unicelulares, cenocíticos, coloniales o pluricelulares, pero sin diferenciación en tejidos u órganos, y que necesitan para su estudio una metodología propia y adecuada a sus pequeñas dimensiones. Bajo esta denominación se engloban tanto microorganismos celulares como las entidades subcelulares.

MICROORGANISMOS CELULARES

Comprenden todos los procariotas y los microorganismos eucarióticos (los protozoos, los mohos mucosos, los hongos y las algas microscópicas). El encuadre de todos estos grupos heterogéneos será abordado en el próximo capítulo.

1.4 Clasificación biológica de los microorganismos en función del grado evolutivo y tipo de célula

1.5 Diferencia entre microorganismos celulares y acelulares

Un protobionte hace referencia a las primeras estructuras y formaciones de moléculas orgánicas que pudieron haber evolucionado en los primeros seres vivos. Dentro de los niveles de complejidad biológica, los protobiontes se consideran precursores de la vida celular.

El protobionte es un agregado acelular de polímeros orgánicos ensamblados espontáneamente de forma abiótica, rodeado por una estructura membranosa. Los protobiontes exhiben algunas de las propiedades que se asocian con la vida, como la reproducción simple, el metabolismo y la excitabilidad, así como el mantenimiento de un medio químico interno diferente del exterior.

Un ejemplo de protobionte está en los experimentos de Aleksandr Oparin y Sidney W. Fox, que han demostrado que pueden formarse espontáneamente en condiciones similares a las que se cree que existían en la época de la formación de la Tierra. En estos experimentos se formaron liposomas y microesferas con estructuras membranosas similares a las bicapas fosfolipídicas de la célula.

A partir de ello, se ha discutido si el origen de la vida y el origen del proceso de evolución surgieron al mismo tiempo. Se ha postulado que, de forma equivalente a cómo actúa el proceso de evolución en los seres vivos, también actuarían los mecanismos evolutivos en compuestos químicos antes de que hubiese vida.

En este sentido, científicos como Martin A. Nowak y Hisashi Ohtsuki han postulado cómo y cuándo la cinética química pasa a convertirse en una dinámica evolutiva, formulando una teoría matemática general para el origen de la evolución. En ella se describe la previda como un alfabeto de activos monómeros que forman al azar polímeros, siendo un sistema generativo que puede producir la información, en la que originalmente se presenta una preevolutiva dinámica de selección y mutación, pero no replicación, a diferencia de la vida. A partir de análisis matemático se concluye que las mejores y más competentes

candidatas moleculares para la vida ya habían sido seleccionadas antes incluso de que empezaran a reproducirse. Igualmente, aunque la previda es un andamiaje en que se basa la vida, existe una fase de transición en la que, si la tasa efectiva de replicación supera un valor crítico, entonces la vida compite con la previda y, finalmente, la vida destruye a la previda.²

1.6 Características anatómo-morfológicas y fisiológicas de los virus.

Los microorganismos acelulares

Los virus.

Los virus son partículas microscópicas, de estructura muy sencilla y de tamaño no superior a los 2500 angstroms. No tienen estructura celular ya que carecen de citoplasma y de las enzimas necesarias para realizar un metabolismo. No se nutren, no se relacionan, carecen de metabolismo propio y para reproducirse utilizan la maquinaria metabólica de las células a las que parásita; su simplicidad estructural y funcional los convierte en parásitos intracelulares obligados, tanto de bacterias (bacteriófagos), como de las células animales y vegetales.

Los virus pueden presentar dos fases:

Fase extracelular. Se encuentran fuera de las células y son totalmente inertes. A los virus, en su fase extracelular se les denomina partículas víricas o viriones.

Fase intracelular. Se adhieren a la superficie de células e introducen en ellas su genoma vírico (ADN o ARN). De esta manera se pueden reproducir, ya que el genoma vírico es capaz de replicarse y de dirigir la síntesis de cubiertas de nuevos virus utilizando la materia, la energía y el sistema enzimático de la célula hospedadora.

Interés de los virus.

La principal problemática de los virus, es que causan enfermedades, estas enfermedades pueden ir desde las más comunes como los resfriados, la gripe, la varicela o el herpes simple, hasta enfermedades más graves como el ébola, el SIDA, la gripe aviar.

Además, los virus no solo provocan enfermedades a los humanos, sino que afectan a todo tipo de vida celular y, aunque los virus existen en todo el mundo, cada especie celular

tiene un grupo de virus específico, que a menudo sólo infectan esta especie. Los virus son importantes patógenos del ganado. Enfermedades como la fiebre aftosa y la lengua azul son causadas por virus. Los animales de compañía (como perros, gatos y caballos), si no se les vacuna, son susceptibles a infecciones víricas graves.

Pero los virus también tienen su lado bueno en ámbitos como la medicina. Los virus son útiles como sistemas modelo para estudiar los mecanismos que controlan la información genética, ya que en esencia son pequeñas piezas de esta información. Esto permite a los científicos estudiar sistemas de replicación más simples y manejables, pero que funcionan con los mismos principios que los de la célula huésped. Gran parte de la investigación sobre los virus pretende conocer su mecanismo replicativo, para encontrar así el modo de controlar su crecimiento y eliminar las enfermedades virales. Los estudios sobre las enfermedades víricas han contribuido enormemente para comprender la respuesta inmune del organismo frente a los agentes infecciosos. Estudiando esta respuesta, se han descrito a fondo los anticuerpos séricos y las secreciones de las membranas mucosas, que ayudan al organismo a eliminar elementos extraños como los virus. Ahora, el interés científico se centra en la investigación destinada a aislar ciertos genes virales. Éstos podrían clonarse para producir grandes cantidades de determinadas proteínas, que serían utilizadas como vacunas.

1.7 Clasificación de los virus en función a su impacto médico.

VIRUS Y PARTICULAS SUBVIRASICAS

Otro tipo de objetos de estudio de la microbiología son las entidades no celulares, que a pesar de no poseer ciertos rasgos atribuibles a lo que se entiende por vida, cuentan con individualidad y entidad biológica, y caen de lleno en el dominio de esta ciencia.

Los virus son entidades no celulares de muy pequeño tamaño (normalmente inferior al del más pequeño procarionta), por lo que debe recurrirse al microscopio electrónico para su visualización. Son agentes infectivos de naturaleza obligadamente parasitaria intracelular, que necesitan su incorporación al protoplasma vivo para que su material genético sea replicado por medio de su asociación más o menos completa con las actividades celulares normales, y que pueden transmitirse de una célula a otra. Cada tipo

de virus consta de una sola clase de ácido nucleico (ADN o ARN, nunca ambos), con capacidad para codificar varias proteínas, algunas de las cuales pueden tener funciones enzimáticas, mientras que otras son estructurales, disponiéndose éstas en cada partícula virásica (virión) alrededor del material genético formando una estructura regular (cápsida); en algunos virus existe, además, una envuelta externa de tipo membranoso, derivada en parte de la célula en la que se desarrolló el virión (bicapa lipídica procedente de membranas celulares) y en parte de origen virásico (proteínas).

En su estado extracelular o durmiente, son totalmente inertes, al carecer de la maquinaria de biosíntesis de proteínas, de replicación de su ácido nucleico y de obtención de energía. Esto les obliga a un modo de vida (*sic*) parasitario intracelular estricto o fase vegetativa, durante la que el virión pierde su integridad, y normalmente queda reducido a su material genético, que al superponer su información a la de la célula hospedadora, logra ser expresado y replicado, produciéndose eventualmente la formación de nuevos viriones que pueden reiniciar el ciclo.

Los viroides son un grupo de nuevas entidades infectivas, subvirásicas, descubiertas en 1967 por T.O. Diener en plantas. Están constituidos exclusivamente por una pequeña molécula circular de ARN de una sola hebra, que adopta una peculiar estructura secundaria alargada debido a un extenso, pero no total, emparejamiento intracatenario de bases por zonas de homología interna. Carecen de capacidad codificadora y muestran cierta semejanza con los intrones autocatalíticos de clase I, por lo que podrían representar secuencias intercaladas que escaparon de sus genes en el transcurso evolutivo. Se desconocen detalles de su modo de multiplicación, aunque algunos se localizan en el nucleoplasma, existiendo pruebas de la implicación de la ARN polimerasa II en su replicación, por un modelo de círculo rodante que genera concatémeros lineares. Esta replicación parece requerir secuencias conservadas hacia la porción central del viroide. Los viroides aislados de plantas originan una gran variedad de malformaciones patológicas. El mecanismo de patogenia no está aclarado, pero se sabe que muchos de ellos se asocian con el nucleolo, donde quizá podrían interferir; sin embargo, no existen indicios de que alteren la expresión génica (una de las hipótesis sugeridas); cada molécula de viroide contiene uno o dos dominios conservados que modulan la virulencia.

En 1986 se descubrió que el agente de la hepatitis delta humana posee un genoma de ARN de tipo viroide, aunque requiere para su transmisión (pero no para su replicación) la colaboración del virus de la hepatitis B, empaquetándose en partículas similares a las de este virus. A diferencia de los viroides vegetales, posee capacidad codificadora de algunas proteínas.

Los ARNs satélites son pequeñas moléculas de tamaño similar al de los viroides de plantas (330-400 bases), que son empaquetados en cápsidas de determinadas cepas de virus (con cuyos genomas no muestran homologías). Se replican sólo en presencia del virus colaborador específico, modificando (aumentando o disminuyendo) los efectos patógenos de éste.

Los virusoides constituyen un grupo de ARNs satélites no infectivos, presentes en el interior de la cápsida de ciertos virus, con semejanzas estructurales con los viroides, replicándose exclusivamente junto a su virus colaborador.

Los priones son entidades infectivas de un tipo totalmente nuevo y original, descubiertas por Stanley Prusiner en 1981, responsables de ciertas enfermedades degenerativas del sistema nervioso central de mamíferos (por ejemplo, el "scrapie" o prurito de ovejas y cabras, la encefalitis espongiforme bovina), incluyendo los humanos (kuru, síndrome de Gerstmann-Straüssler, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob). Se definen como pequeñas partículas proteicas infectivas que resisten la inactivación por agentes que modifican ácidos nucleicos, y que contienen como componente mayoritario (si no único) una isoforma anómala de una proteína celular. Tanto la versión celular normal (PrP^C) como la patógena (PrP^{Sc} en el caso del "scrapie") son glicoproteínas codificadas por el mismo gen cromosómico, teniendo la misma secuencia primaria. Se desconoce si las características distintivas de ambas isoformas estriban en diferencias entre los respectivos oligosacáridos que adquieren por procesamiento post-traduccional.

A diferencia de los virus, los priones no contienen ácido nucleico y están codificados por un gen celular. Aunque se multiplican, los priones de nueva síntesis poseen moléculas de PrP que reflejan el gen del hospedador y no necesariamente la secuencia de la molécula del PrP que causó la infección previa. Se desconoce su mecanismo de multiplicación, y para discernir entre las diversas hipótesis propuestas quizá haya que dilucidar la función del producto normal y su posible conversión a la isoforma patógena infectiva.

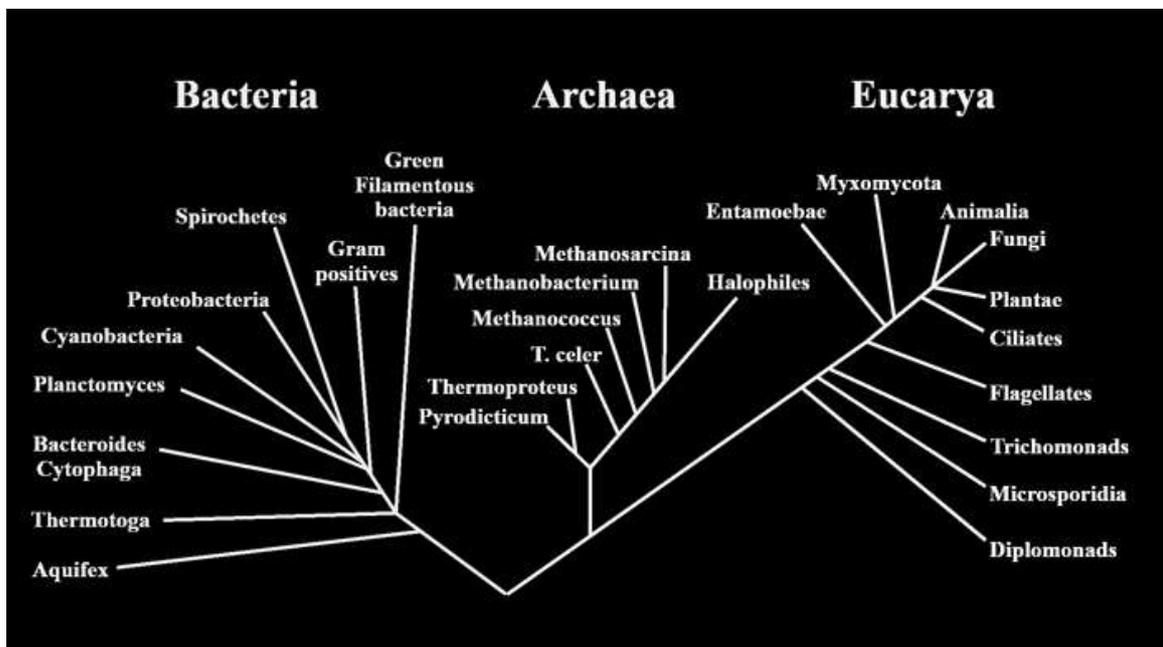
Recientemente se ha comprobado que, al menos algunas de las enfermedades por priones son simultáneamente infectivas y genéticas, una situación insólita en la Patología humana, habiéndose demostrado una relación entre un alelo dominante del PrP y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. El gen del prión (*Prn-p*) está ligado genéticamente a un gen autosómico (*Prn-i*) que condiciona en parte los largos tiempos de incubación hasta el desarrollo del síndrome. (Iáñez, 2018)

UNIDAD II

BACTERIOLOGÍA

2.1 Características bacterianas

De acuerdo al Arbol de la Vida de Woese, microbiólogo creador de la nueva taxonomía molecular basada en la comparación entre especies de la fracción 16s del ARN ribosomal, se proponen 3 dominios Archaea, Bacteria y Eucarya, en los que se incluye a todos los seres vivos, aunque existen controversias.



Árbol filogenético de la vida, propuesto por Carl Woese. Las relaciones entre los tres dominios aún se encuentran en debate, así como su posición en la raíz del árbol.

Los dominios Archaea y Bacteria corresponden a las células procariotas, una de cuyas características es la de carecer de membrana nuclear. Con base en el estudio de fósiles y modelos, se calcula que emergieron hace unos 3.6 - 4 billones de años. Su importancia radica en el hecho de haber desarrollado una pared celular o membrana externa que les confirió, desde el principio, de autonomía y protección con respecto a su medio ambiente. Desde entonces constituyeron la forma de vida más abundante en el planeta en términos de biomasa y número de especies.

A pesar de su menor complejidad en relación a Eucarya, los integrantes de los dominios Archaea y Bacteria pueden vivir en hábitats extremos: se les encuentra en las profundidades de la Tierra, sobreviviendo gracias al lento catabolismo del carbono orgánico depositado en los sedimentos, y en las profundas fuentes hidrotermales submarinas.

Se acepta la aparición del dominio Eukarya, con membrana nuclear y orgánulos más desarrollados, desde hace unos dos billones de años; de este dominio derivan todos los organismos eucariontes uni y multicelulares. Otra clasificación de los seres vivos muy utilizada es la propuesta por Whittaker y Margulis. Ellos clasifican a los organismos en cinco reinos, Animalia, Plantae, Fungi, Protista y Monera, en éste último reino se incluyen todas las bacterias.

IMPORTANCIA

Los miembros pertenecientes a los dominios Bacteria y Archaea son las formas más abundantes en el planeta. Las bacterias constituyen una proporción significativa por lo que respecta al peso corporal de los diferentes hospederos (desde 0.5 k hasta unos 2.5 k). Su biomasa total llegó a estimarse en 3.5×10^{14} kg de carbono. Sin embargo, en 2008 solo se aceptaban ~7,000 especies microbianas, versus 300 000 especies de plantas y 1 250 000 de animales, lo cual no refleja la biodiversidad total de las bacterias. (Achtman et al., 2008).

La Bacteriología es una disciplina de la Microbiología, que ha estado presente a lo largo de la historia de la humanidad. Las bacterias son responsables de millones de muertes de personas a nivel mundial. Entre algunas enfermedades infecciosas bacterianas, causantes de grandes epidemias que han mermado la población, se encuentran: la difteria, cólera,

tuberculosis, sífilis, tétanos, tos ferina, y fiebre tifoidea. Sin embargo, también existen infecciones bacterianas que aunque están asociadas en menor frecuencia como causa de muerte, son un problema de salud pública en países en vías de desarrollo como el nuestro, entre las que se puede mencionar algunas de las enfermedades "menospreciadas", emergentes.

Otro aspecto de primordial importancia en bacteriología es la microbiota del cuerpo humano, en especial del tracto gastrointestinal. Se estima que en el intestino de un ser humano adulto, existe un billón (10¹²) de microorganismos por mililitro de contenido fecal y alberga entre 500 y 1000 diferentes especies bacterianas. La mayoría de esos microorganismos pertenecen al Dominio Bacteria, que incluye tanto a bacterias gramnegativas como grampositivas. La microbiota intestinal difiere de una persona a otra y esa diversidad se ha visto en la composición del lumen (heces) y de la mucosa (epitelial), aunque el genotipo del hospedero es más importante en determinar la microbiota intestinal que la dieta, edad y estilo de vida.

La microbiota intestinal está implicada en una gran variedad de funciones en el hospedero, involucrando cambios en el epitelio intestinal, modulación inmune, movimiento intestinal y el metabolismo de algunas drogas. La microbiota también está involucrada en la degradación de algunas toxinas y carcinógenos que se ingieren en la dieta, síntesis de micronutrientes, fermentación de sustancias del alimento, ayuda en la absorción de electrolitos y minerales; asimismo afecta el desarrollo y diferenciación de los enterocitos, a través de la producción de ácidos grasos de cadena corta. Finalmente, la microbiota previene la colonización del intestino por bacterias patógenas como: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Clostridium* y *Shigella*.

Actualmente se ha resaltado el papel que tiene la microbiota en la obesidad del humano. Las actividades metabólicas de la microbiota intestinal facilitan la extracción de calorías de los alimentos ingeridos y el almacenaje de esas calorías en el tejido adiposo del hospedero, para su posterior utilización y proveen energía y nutrimentos para el desarrollo y proliferación microbiana. Las diferencias en la recuperación de energía en los individuos puede ofrecer una explicación fisiológica del porqué algunos pacientes

presentan obesidad, pero no comen en abundancia. Se ha sugerido que la microbiota intestinal de algunas personas tiene una eficiencia metabólica específica y que ciertas características en la composición de la microbiota pueden predisponer a obesidad.

Por otra parte, las bacterias presentan un metabolismo tan diverso que les permite llevar a cabo funciones tales como: La fijación de nitrógeno (conversión de nitrógeno gaseoso a amonio), la fijación de una cantidad importante de CO₂, la metanogénesis (producción biológica de metano), así como la reducción de azufre y fierro.

Hay bacterias con capacidad para metabolizar los plaguicidas clorados e hidrocarburos. Actualmente se trabaja en la producción de polímeros bacterianos biodegradables para sustituir a los plásticos sintéticos. Además, mediante a procesos vigentes a nivel industrial, las bacterias se utilizan en la producción de antibióticos (bacitracina, cefalosporina, cloranfenicol, cicloheximida, lincomicina, nistatina, penicilina, polimixina B, estreptomina, son algunos de ellos); vitaminas tales como la vitamina B12 y la riboflavina, cuya síntesis es más fácil por fermentación; aminoácidos, por fermentación directa o síntesis enzimática, entre ellos el ácido aspártico y la fenilalanina (ingredientes del aspartame), el ácido glutámico (empleado como saborizante bajo la forma de glutamato monosódico), la lisina (aditivo alimentario). Por lo que respecta a enzimas microbianas, éstas se producen comercialmente y se emplean en la elaboración de jarabes edulcorantes, detergentes, ablandadores de carnes.

Las aplicaciones prácticas de las bacterias en la ingeniería genética incluyen: vacunas virales (citomegalovirus, hepatitis B, sarampión, rabia); proteínas y péptidos (insulina, factor estimulante del crecimiento, interferón alfa, interferón beta, factor de necrosis tumoral y otros que aún no se encuentran en el mercado); vegetales y animales transgénicos; regulación y terapia génicas.

2.2 Clasificación, morfología y estructura de las bacterias

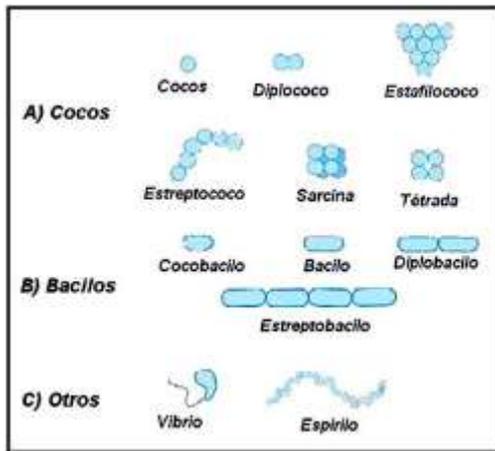
La tipificación de las bacterias se basa en el estudio de sus características mediante técnicas que oscilan entre las más sencillas tinciones y los más complejos estudios moleculares. Una técnica útil y de bajo costo consiste en la tinción de Gram y posterior

observación de la muestra mediante el microscopio de luz para estudiar las bacterias, su forma, tipo de agrupación y color: grampositivas o gramnegativas. La mayor parte de las bacterias puede ser ubicada en uno de estos dos grupos o en un tercero, de acuerdo a la ácido-alcohol resistencia que presenten (Ziehl-Neelsen).

Algunas propiedades genéticas y fisiológicas constituyen herramientas utilizadas para definir algunas características de las cepas, como los serotipos y biotipos, determinación de especies en algunos grupos de bacterias, producción de toxinas. Los métodos más sensibles se basan en el análisis del material genético. Cabe mencionar que éstos han diversificado sus objetivos; se emplean en la identificación de subgrupos de genes esenciales para el crecimiento, colonización, adhesión e invasión bacterianos (un ejemplo es el IVET - siglas de "in vivo expression technology"), desarrollada para seleccionar los genes activos únicamente durante la infección).

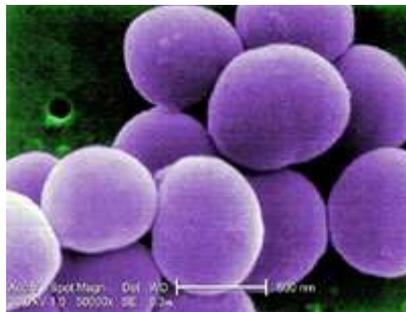
MORFOLOGÍA BACTERIANA

Las bacterias que tienen forma esférica u ovoide se denominan cocos. Y si se tiñen de azul con el Gram, se les llama grampositivos. Cuando los cocos se agrupan en cadenas, se les denomina estreptococos y cuando lo hacen en racimos, se les llama estafilococos; también se pueden agrupar en pares que reciben el nombre de diplococos. Las bacterias en forma de bastón reciben el nombre de bacilos. Si al teñirlos con el Gram quedan de color rojo, se les denomina gramnegativos. Los bacilos curvados que presentan espirales se llaman espirilos, rígidos; algunas bacterias en espiral presentan formas fácilmente reconocibles, como las espiroquetas, semejantes a un tornillo o sacacorchos, flexibles. Las bacterias que carecen de pared celular tienen gran plasticidad (micoplasmas) y adoptan una variedad de formas. Las bacterias esféricas tienen un tamaño promedio de 1 micrómetro de diámetro, mientras que los bacilos miden 1.5 de ancho por 6 micrómetros de largo.

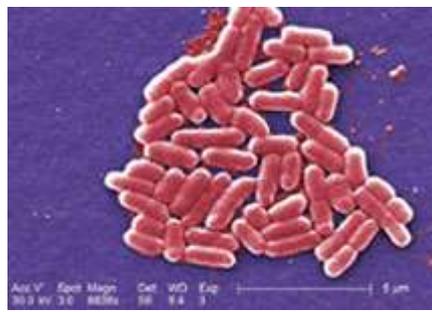


Diferentes formas y agrupamientos que presentan las bacterias.

Ejemplos de formas y tinción bacterianas:



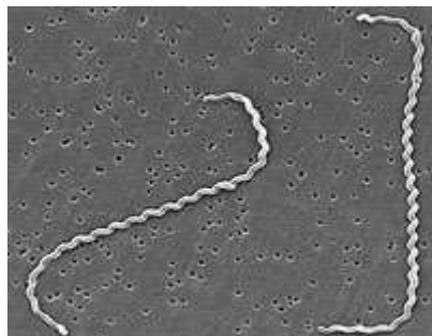
SEM. *Staphylococcus aureus*.
Cocos Gram positivos. CDC/
Matthew J. Arduino, DRPH



SEM. *Escherichia coli*. Bacilos
cortos gram negativos no
esporulados, flagelados. CDC/
Janice Haney Carr



Campo oscuro. *Treponema pallidum*. Se le ubica dentro de
las espiroquetas. CDC



SEM. *Leptospira interrogans*.
Borrelia,
Leptospira y *Treponema* conforman
las familias de espiroquetas

Formas de agrupamiento y división bacterianos (cocos):

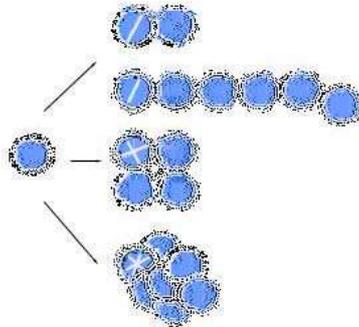
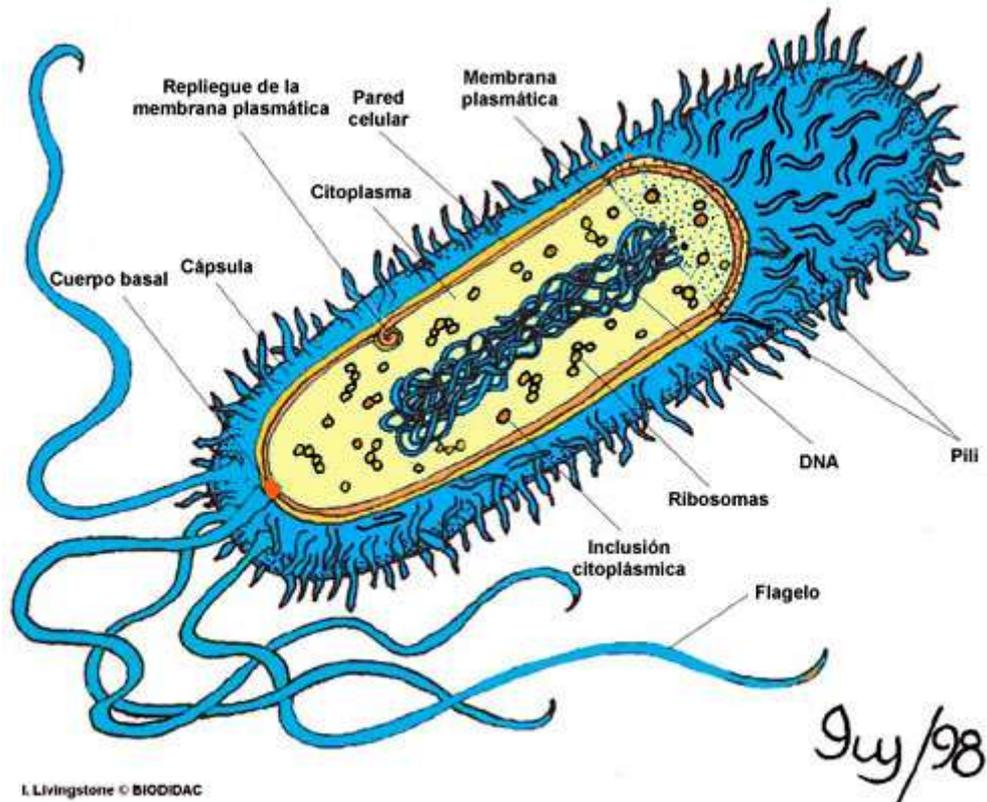


Imagen: Teresa Uribarren
Berrueta

ESTRUCTURA BÁSICA

Citoplasma:

En el citoplasma se encuentran todas las enzimas necesarias para división y metabolismo bacterianos, asimismo, cuenta con ribosomas de menor tamaño en relación a células eucariotas, pero no presenta mitocondrias, retículo endoplásmico ni cuerpo de Golgi; las enzimas para el transporte de electrones se encuentran en la membrana citoplásmica. Los pigmentos requeridos por bacterias fotosintéticas se localizan en vesículas debajo de la mencionada membrana. Las reservas se observan como gránulos insolubles (azufre, glucógeno, fosfatos y otros). La base del citoplasma es parecida a un gel en la que se identifican vitaminas, iones, agua, nutrimentos, desechos, el nucleoide y plásmidos.



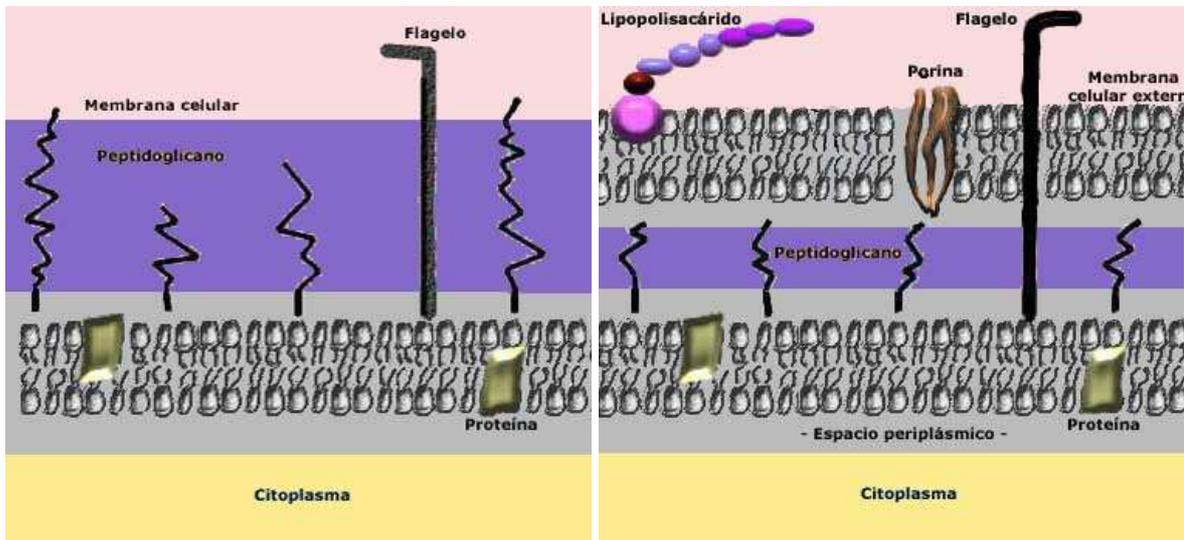
Pared celular:

Con la tinción de Gram, una proporción importante de bacterias puede dividirse en dos grandes grupos: grampositivas (se observan de color azul - debido al colorante cristal violeta) y gramnegativas (pierden el cristal violeta y conservan la safranina - se aprecian de color rojo o rosado). La técnica se basa en las diferencias físicas fundamentales de la pared celular y emplea colorantes catiónicos (cristal violeta y safranina), que se combinan con elementos cargados negativamente.

Las bacterias grampositivas cuentan con tres capas externas: cápsula (en algunos casos), pared celular gruesa y membrana citoplásmica. Las bacterias gramnegativas presentan cápsula (algunas), una pared celular delgada, membrana externa (que equivale al lipopolisacárido) y una membrana interna (citoplásmica).

La pared celular le da forma a la bacteria y su composición varía entre bacterias. En bacterias grampositivas, consiste de varias capas de peptidoglucano (formado por los azúcares N-acetilglucosamina más N-acetilmurámico y un tetrapéptido) que retienen el cristal violeta utilizado en la tinción de Gram; otros componentes de la pared incluyen redes de ácido teicoico y ácido lipoteicoico. Las bacterias gramnegativas cuentan con dos

membranas (una externa y una interna) así como una capa delgada de peptidoglucano entre ambas, en el llamado espacio periplásmico.



Esquema. Pared celular bacteria grampositiva. T. Uribarren B.

Esquema. Pared celular bacteria gramnegativa. T. Uribarren B.

La membrana citoplásmica:

Debajo de la pared celular se encuentra la membrana citoplasmática, la capa más interna, compuesta por proteínas y fosfolípidos (bicapa lipídica). Sus funciones son la permeabilidad selectiva y transporte de solutos (la mayor parte de las moléculas que la atraviesan no lo hacen de forma pasiva), la fosforilación oxidativa en los organismos aeróbicos, la liberación de enzimas hidrolíticas y el reciclamiento de receptores.

Lipopolisacárido (LPS):

Formado por fosfolípidos y proteínas de membrana externa. El LPS está constituido por tres partes bioquímicamente diferentes: una cadena de azúcares, el polisacárido llamado antígeno somático u "O", se utiliza para tipificar cepas bacterianas, una porción lipídica, el lípido A, que está anclado a los lípidos de la membrana) y es tóxica para el humano y animales. Entre ambos se encuentra el polisacárido central, llamado core. Los llamados bacilos ácido-alcohol resistente (BAAR) como *Mycobacterium*, presentan una pared compuesta de una capa muy delgada de peptidoglucano, una gran cantidad de lípidos (60%), principalmente ácidos micólicos, responsables en parte de la acido-alcohol resistencia, así como de la hidrofobicidad y de la consistencia "de cera" de estos

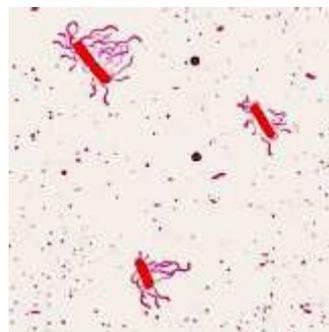
microorganismos. Los peptidoglucanos les confieren una forma estable e impiden la ósmosis lítica. La técnica que se utiliza para teñir estas bacterias, se denomina de Ziehl-Neelsen y es una mezcla de fucsina básica y fenol, calor y contraste con azul de metileno; al finalizar la técnica, los organismos ácido-alcohol resistente se aprecian rojos, mientras que el fondo se tiñe de azul.

Espacio periplásmico:

Este espacio que se ubica entre la membrana interna y la membrana externa presente solo en las bacterias gramnegativas. Contiene proteínas de unión para los sustratos específicos, enzimas proteolíticas y quimiorreceptores. Es una solución densa, con alta concentración de macromoléculas, y participa e en la regulación de la osmolaridad con respecto al medio externo

Cápsula y glicocálix:

Es una cubierta de grosor variable formada habitualmente por unidades de polisacáridos, proteínas o ambos. Si está bien estructurada y se encuentra bien adherida a la célula, se le denomina cápsula; si por el contrario, tiene estructura mal definida y su adhesión es débil, se le conoce como glicocálix. De acuerdo a su estructura química, puede ser flexible o rígida. La rigidez le confiere la característica de una matriz impermeable. Determina la adhesión a superficies (biopelículas), constituye una barrera de protección contra la fagocitosis y los anticuerpos e impide la desecación y la acción de otros agentes. Actúa como barrera de difusión ante algunos antibióticos. Ejemplos de bacterias con cápsula son *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*.



Bacillus cereus. Flagelos. CDC.

Flagelos:

Son apéndices filamentosos y muy finos compuestos por la proteína flagelina dispuesta en fibras helicoidales y con apariencia lisa, anclados a la pared celular. Presentan un gancho,

que une el filamento al cuerpo basal (parte motora). Su función es el desplazamiento de la célula mediante movimientos variables de rotación. Su distribución es variable, así como su número. Independientemente del mecanismo de locomoción que desplieguen las bacterias, éste les permite responder en sentido positivo o negativo a gradientes fisicoquímicos (quimiotropismo, fototropismo). Son muy antigénicos.

Pili y Fimbrias:

Estructuras más delgadas y cortas que los flagelos. Actúan como órganos de fijación entre células (bacteria - bacteria, bacteria - célula eucariota) También se les relaciona con la formación de biopelículas y la conjugación (pilis sexuales). Factores de relevancia en la colonización. Ejemplo: las fimbrias de *Streptococcus pyogenes* contienen el principal factor de virulencia, la proteína M.

Espora:

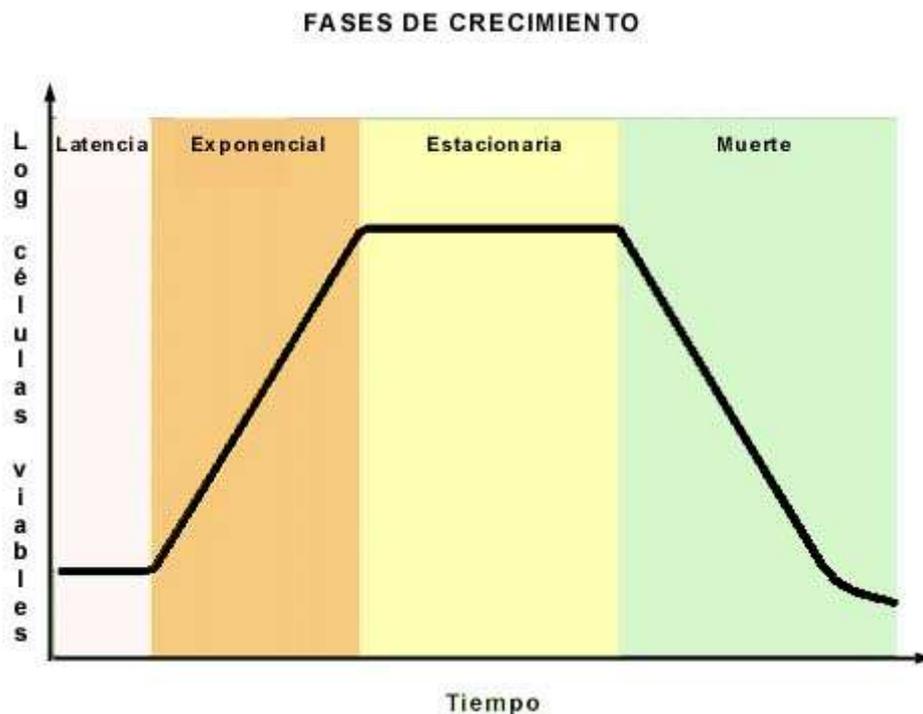
La espora es una estructura formada por algunas especies de bacterias grampositivas, por ejemplo: *Clostridium* y *Bacillus*. Es una estructura altamente diferenciada cuyas características le confieren gran resistencia ante el medio ambiente y agentes nocivos. En ambientes hostiles sufre cambios estructurales y metabólicos que dan lugar a una célula interna en reposo, la endospora, que puede ser liberada como una espora. Son altamente resistentes a la desecación, calor, luz ultravioleta y agentes químicos (bacteriocidas). Son altamente resistentes a la desecación, calor, luz ultravioleta y agentes químicos bacteriocidas.

2.3 CRECIMIENTO Y METABOLISMO

La multiplicación celular es una consecuencia directa del crecimiento y da lugar, en el caso de las bacterias, a colonias, mediante un sistema de reproducción asexual denominado división binaria. Los procesos sintéticos involucrados en el crecimiento bacteriano incluyen más de 2 000 reacciones bioquímicas. La velocidad de crecimiento es el cambio en número de bacterias por unidad de tiempo, y se expresa como el tiempo de generación, que es el tiempo necesario para que se duplique una bacteria o una población de ellas.

En un sistema cerrado o cultivo en medio no renovado se obtiene una curva de crecimiento típica que se ha dividido en cuatro fases: fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte. La fase de latencia se caracteriza por la adaptación de

los microorganismos, no se presenta cuando el inoculo es nuevo y si el inoculo proviene de un cultivo viejo, requiere de este periodo de adaptación. La mayor parte de las bacterias crece de forma exponencial, aunque hay una serie de condiciones que influyen (nutrimentos en el medio, temperatura, factores genéticos). En la fase estacionaria no hay una modificación neta en el número de células, existe un frágil equilibrio que desaparece eventualmente cuando aún las bacterias metabólicamente activas mueren, debido a productos tóxicos y falta de nutrimentos (factores presentes en la fase estacionaria) aunados a enzimas liberadas por la lisis bacteriana.



Producción de energía:

En las bacterias, la conservación intracelular de energía también ocurre principalmente por medio de la síntesis de ATP. Los métodos usados por las bacterias para generar este ATP son principalmente:

Respiración aeróbica: Proceso metabólico en el que el oxígeno molecular es el aceptor final de electrones. El oxígeno es reducido a agua. Utilizada por bacterias aeróbicas.

Respiración anaeróbica: En este proceso, el aceptor final de electrones son otros compuestos, tales como nitratos o sulfatos. Utilizada por bacterias anaerobias obligadas, aunque algunas, sobre todo las de mayor importancia médica, utilizan la fermentación.

Existen las bacterias facultativas, que pueden utilizar los dos tipos de respiración aeróbica y anaeróbica.

Fermentación: Aquí un intermediario orgánico derivado de un sustrato capaz de ser fermentado, es el aceptor final de electrones. Un ejemplo: la fermentación de glucosa (sustrato) a ácido láctico; un producto intermediario, el piruvato, es el aceptor final de electrones.

2.4 Genética bacteriana

El genoma bacteriano consiste en uno o más cromosomas, que contienen los genes necesarios y una gran variedad de plásmidos que generalmente codifican para genes no esenciales. El cromosoma está constituido por una doble hebra de DNA circular. Presenta dominios de superenrollamiento debido a que se dobla y tuerce para ser almacenado en la célula, que en promedio, mide 1 micrómetro. Este genoma mide entre 1 - 6 millones de pares de bases de DNA (es decir, de 1 - 6 Mb). El nombre nucleóide sirve para identificar a este DNA no confinado por una membrana. Cuando la célula se encuentra en fase logarítmica (de crecimiento rápido) pueden encontrarse varias copias cromosómicas, completas o parciales. Las bacterias son microorganismos organismos haploides y se dividen por fisión binaria, cuyo tiempo de generación varía desde 20 minutos hasta varias horas. Las bacterias pueden intercambiar material genético mediante tres mecanismos: transformación, conjugación y transducción.

Plásmidos. Algunas bacterias poseen elementos genéticos extracromosomales, llamados plásmidos, son pequeños fragmentos circulares de doble cadena de DNA que se mantienen en un número estable y contienen los genes necesarios para replicarse y para su transferencia a otras células, así como para sintetizar toxinas, algunas estructuras de superficie (adhesinas) y para la resistencia a antibióticos (plásmidos R).

Bacteriófagos, conocidos también como "fagos", son parásitos intracelulares (virus) de bacterias. Están constituidos por DNA o RNA y proteínas. Si lisan a la bacteria infectada se habla de una infección lítica; si se integran al genoma bacteriano y se encuentran en estado quiescente (profagos con el potencial de producir fagos) se habla de una bacteria en estado lisogénico. Debe considerarse la abundancia de fagos en el planeta, con una estimación de $>10^{31}$ y el hecho de que fagos y las bacterias hospederas coexisten en

prácticamente todos los ecosistemas. Los encuentros entre ambos llevan a la selección de fagos evolucionados que se adaptan en respuesta a las defensas bacterianas.

Transposones e integrones. Los transposones son segmentos de DNA de gran movilidad, simples o compuestos; dan lugar a mutaciones, ya sea por inserción o pérdida de genes o diseminación de los mismos entre células. Cabe señalar que en los transposones se encuentran habitualmente los genes que determinan la síntesis de toxinas, factores de adhesión, virulencia o resistencia a algunos antibióticos. Mientras que los integrones son elementos genéticos capaces de captar y expresar genes en casetes de resistencia a antibióticos. Tanto los transposones como los integrones pueden estar integrados en plásmidos y/o en el cromosoma bacteriano.

Islas de patogenicidad. Las islas de patogenicidad son secuencias de DNA que se caracterizan por contener genes asociados a virulencia y que pueden estar tanto en plásmidos, como en el cromosoma bacteriano. Poseen también elementos genéticos móviles, como transposasa e integrasas, que les permiten insertarse en ciertos sitios dentro del genoma bacteriano. Tienen un tamaño de entre 10 y 500 kpb (miles de pares de bases). Entre los genes de virulencia asociados a estas islas de patogenicidad tenemos: adherencia, producción de toxinas, invasividad, resistencia a antibióticos y formación de biopelículas.

2.5 Patogenicidad microbiana

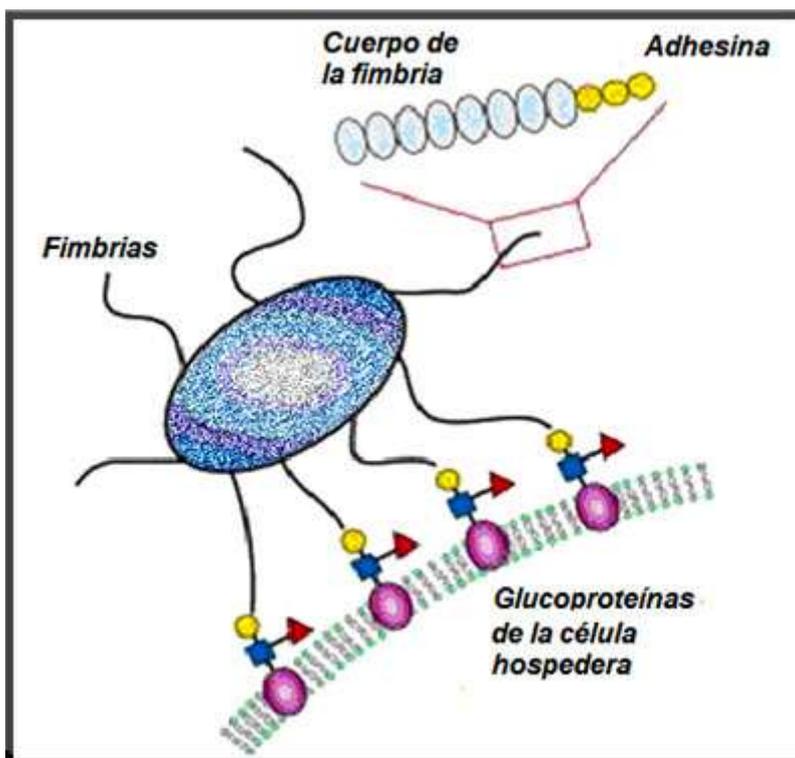
CLASIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE PATOGENICIDAD

- Datos recientes sugieren que una elevada carga bacteriana en sitios de colonización puede ser promovida por la agregación inducida por bacteriófagos, lo que, a su vez, aumenta la probabilidad de translocación bacteriana en el torrente sanguíneo y posiblemente una mayor diseminación en la población general (York. 2018).

l) Factores que promueven la colonización e invasión al hospedero (fimbrias, pilis, adhesinas no fimbriales, unión e internalización a células M, movilidad y quimiotaxis, proteasa de IgA, sideróforos, cápsula, variación en antígenos de superficie).

Fimbrias. Son apéndices que consisten de subunidades de proteínas que están ancladas ya sea en la membrana externa de las bacterias gramnegativas, o en la pared celular de las bacterias grampositivas. Las fimbrias pueden ser rígidas o flexibles. La función principal de las fimbrias es servir como soporte de las adhesinas, encargadas de reconocer a su receptor en la célula hospedera.

Adhesinas. Las adhesinas son, por lo general, lectinas (proteínas que tienen afinidad por los azúcares) y su función es la adherencia. La mayoría de las bacterias expresan más de un tipo de adhesinas. En algunos casos, la fimbria posee dos o más adhesinas distintas para dos o más receptores diferentes y se les llama adhesinas fimbriales. Las adhesinas que no están en fimbrias son denominadas adhesinas afimbriales y algunos ejemplos son: proteínas de membrana externa de las bacterias gramnegativas, ácidos lipoteicoicos de bacterias grampositivas, glucocalix, proteínas F y M de *Streptococcus* sp. Y tienen como función unirse en forma estrecha a la célula hospedera.



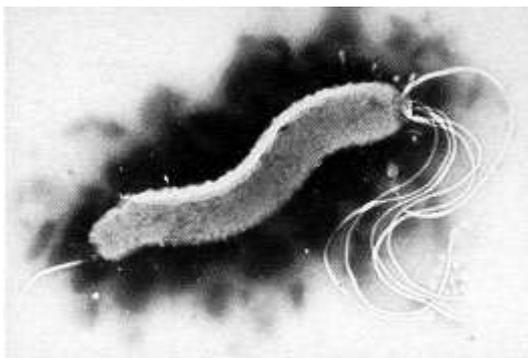
Las adhesinas fimbriales son parte constitutiva de una fimbria y las moléculas encargadas de asegurar la adhesión de esa estructura a su receptor en la célula hospedera.

Unión e internalización en células M. Las células M son células epiteliales especializadas, que representan el 10% del total de células presentes en las placas de Peyer. Están

localizadas en el epitelio intestinal intercaladas con los enterocitos, justo por arriba de los nódulos linfáticos. La función principal de las células M es la absorción de partículas desde la luz gastrointestinal transportándola hacia la región vasolateral rica en linfocitos y otras células inmunes; además, debido a su bajo contenido en lisozima, pueden transportar antígenos con una casi nula degradación enzimática. Las células M son endocíticas por naturaleza de modo que las bacterias que se unan a ellas son internalizadas y transportadas al tejido linfoide. Algunas bacterias utilizan a las células M como puerta de entrada para llegar a los tejidos profundos.

Invasión bacteriana. Se define como el proceso por medio del cual un microorganismo penetra al citoplasma de células no fagocíticas (células epiteliales o endoteliales), se replica dentro de éstas, se propaga a células adyacentes y finalmente destruye a las células. Un patógeno intracelular es aquel microorganismo que se internaliza y se replica dentro de células fagocíticas profesionales (neutrófilos y macrófagos).

Movilidad bacteriana. Es la capacidad que tiene la bacteria de desplazarse de un lugar a otro por medio del flagelo, sin un sentido definido. Los flagelos son apéndices largos los cuales se encuentran fijos a la célula por uno de sus extremos y libres por el otro. El filamento del flagelo bacteriano está compuesto de subunidades de una proteína denominada flagelina.



Ejemplo de fimbrias y flagelos bacterianos. *H. pylori*. Microscopía electrónica. Prof. A. Lee y Dr. J. O'Rourke, Escuela de Microbiología e Inmunología, University of New South Wales, Australia). En: Helicobacter.com

Quimiotaxis. Se define como la capacidad que tienen las bacterias de moverse hacia una fuente de nutrientes. Las superficies mucosas están protegidas de la colonización bacteriana debido a que están siendo bañadas constantemente con líquido y presentan

movimiento rápido. En tales casos, la bacteria móvil se dirige hacia la membrana mucosa, teniendo mayor posibilidad de contactar la superficie mucosa, a diferencia de las bacterias inmóviles que carecen de esta capacidad, apoyando esta idea se tiene que muchas de las bacterias que colonizan el intestino delgado y la vejiga son móviles.

Proteasa contra IgA secretora. La viscosidad de la mucina es causada en parte por las moléculas de inmunoglobulina secretoria A (sIgA) que se unen simultáneamente a antígenos bacterianos vía sus sitios de unión al antígeno y la interacción con la mucina por medio de sus porciones Fc. Una estrategia bacteriana que es designada para evitar ser atrapada en la capa de mucina es la producción de una enzima extracelular que rompe la IgA humana en la región de la bisagra. Este rompimiento separa la parte de la sIgA que se une a la bacteria de la parte que interactúa con la mucina. La importancia de que ciertos géneros bacterianos produzcan esta proteasa de sIgA radica en que dichas bacterias pueden colonizar las superficies mucosas con mayor facilidad que aquellas que no producen la proteasa de sIgA.

Mecanismos de captación de hierro. El hierro es un factor importante para el crecimiento de la mayoría de las bacterias. El mejor mecanismo por medio del cual las bacterias captan hierro son los sideróforos, los cuales son compuestos de bajo peso molecular que quelan (atrapan) hierro con alta afinidad. Existen tres tipos principales de sideróforos: catecoles, hidroxamatos y un tercero que es una combinación de ambos. Los sideróforos son producidos por la bacteria y excretados al medio en el cual se unen al hierro y el complejo sideróforo-hierro se une a receptores para sideróforo en la superficie bacteriana, una vez que se ha internalizado el complejo sideróforo-hierro, éste es roto para que libere el hierro en el interior de la bacteria. Algunas bacterias no solo producen sus propios sideróforos sino también producen receptores capaces de unir sideróforos producidos por otras bacterias.

Cápsula. La cápsula es una red de polímeros que cubre la superficie de una bacteria. La mayoría de las cápsulas están compuestas de polisacáridos. Si el polisacárido forma una capa homogénea y uniforme alrededor del cuerpo bacteriano se le llama cápsula y si solo forma una red de trabéculas o una malla alrededor de la bacteria se le llama glucocalix. El papel de la cápsula bacteriana es proteger a la bacteria de la respuesta inflamatoria del hospedero, esto es, activación del complemento y muerte mediada por fagocitosis. La cápsula por sí misma es menos probable que sea opsonizada por C3b y la bacteria puede

no ser ingerida por los fagocitos. La cápsula constituye el llamado antígeno K (capsular). Existen cápsulas que consisten en ácido hialurónico (un polímero de matriz extracelular) como el de *Streptococcus pyogenes* o de ácido siálico (un componente común de las glucoproteínas de la células) se encuentra en algunas cepas de *Neisseria meningitidis*. Este tipo de cápsulas son no inmunogénicas y el hospedero no produce anticuerpos que opsonicen la superficie capsular.

Variación en los antígenos de superficie. Una forma de evadir la acción de los anticuerpos del hospedero es cambiar de un tipo de fimbria a otra, por lo tanto los anticuerpos preformados no se unen a la nueva fimbria formada. La bacteria también cambia otras proteínas de superficie que pueden servir como blanco para los anticuerpos. Algunas bacterias encapsuladas están compuestas de polisacáridos que no desencadenan la formación de anticuerpos porque dichos polisacáridos se parecen mucho a carbohidratos que son ubicuos en los tejidos del hospedero (ácido siálico y ácido hialurónico).

FACTORES QUE PROMUEVEN LA COLONIZACIÓN E INVASIÓN AL HOSPEDERO	
Factor	Comentario
Adhesinas fimbriales	Se encuentra en bacterias gramnegativas y grampositivas y sirve para la adherencia
Adhesinas no fimbriales	En bacterias gramnegativas y grampositivas, su función es la adherencia
Internalización en células M	Invasividad
Movilidad y quimiotáxis	Colonización y permanencia en el hospedero
IgA proteasa	Disminuye la viscosidad del moco
Sideróforos	Ayuda a sobrevivir a la bacteria
Cápsula	Antifagocítica y factor de diseminación

Variación antigénica	Evasión de la respuesta inmune
----------------------	--------------------------------

l) Factores que causan daño al hospedero (exotoxinas, endotoxinas y otros componentes tóxicos de la pared celular, enzimas hidrolíticas y productos bacterianos que provocan una respuesta autoinmune.

Exotoxinas. Las exotoxinas son proteínas de alto peso molecular, elaborada por ciertas bacterias y que se excretan al medio donde se desarrolla la bacteria. Hay que diferenciar entre exotoxina (toxinas excretadas), de las endotoxinas (lipopolisacárido) que forman parte de la membrana externa de las bacterias gramnegativas. Las exotoxinas que dañan una gran variedad de tipos celulares se llaman citotoxinas, mientras las exotoxinas que dañan un tipo específico de células se designan de acuerdo al tipo de célula u órgano afectado por ejemplo neurotoxina, leucotoxina, hepatotoxina y cardiotoxina. También se les da el nombre a las exotoxinas de acuerdo a las especies que las produce o a la enfermedad que están asociadas. Por ejemplo toxina colérica producida por *Vibrio cholerae*, causa el cólera; toxina shiga producida por *Shigella* sp, causa la disentería bacteriana; toxina diftérica producida por *Corynebacterium diphtheriae* causante de difteria; toxina tetánica, producida por *Clostridium tetani*, causante de tétanos.

Las exotoxinas se han dividido en tres grupos de acuerdo a su estructura y función. Un tipo son las toxinas A-B que se les da el nombre por el hecho de que la porción B de la toxina se une a su receptor en la célula hospedera y se separa de la porción A, que media la actividad enzimática responsable de la toxicidad. La mayoría de las toxinas bacterianas bien caracterizadas caen dentro de la categoría A-B, por ejemplo, toxina colérica, tetánica, diftérica y toxina Shiga. El segundo tipo de exotoxinas no tienen las porciones separables A-B y actúan por desorganización de la membrana de las células hospederas. El tercer tipo de toxina, denominado superantígeno también carece de la estructura tipo A-B y actúa por estimulación de las células B para liberar citocinas por ejemplo la toxina de choque tóxico producida por *Staphylococcus aureus*.

Endotoxinas. La endotoxina o lipopolisacárido (LPS) corresponde a la membrana externa de las bacterias gramnegativas. La porción lipídica (lípidio A) está embebido en la membrana externa con el core, las porciones del antígeno "O" se extienden hacia afuera de la superficie de la bacteria. El lípidio A es la porción tóxica de la molécula, ejerce su

efecto solamente cuando la bacteria se lisa. La lisis ocurre como resultado del efecto del complejo de ataque a membrana o por el complemento, ingestión y destrucción por fagocitos o la muerte por ciertos tipos de antibióticos.

Otros componentes tóxicos de la pared celular.

Las bacterias grampositivas no tienen endotoxinas, pero la presencia de esas bacterias en el tejido provoca una respuesta inflamatoria que es idéntica a la desencadenada por el lipopolisacárido. Asimismo, las bacterias grampositivas en el torrente sanguíneo causan el mismo tipo de síntomas de choque séptico como las bacterias gramnegativas. Para explicar la manera en que las bacterias grampositivas desencadenan el mismo tipo de efectos fisiológicos ocasionados por el LPS, se ha sugerido, que el peptidoglicano y los ácidos teicoicos y lipoteicoicos son responsables de esos efectos.

Enzimas hidrolíticas. Muchas bacterias producen enzimas hidrolíticas, tales como hialuronidasa, que degrada componentes de la matriz extracelular y de ésta forma lesiona la estructura de los tejidos del hospedero. Otra enzima es la DNasa la cual reduce la viscosidad de los residuos de células muertas del hospedero (pus) y por lo tanto, ayuda a la propagación de la bacteria a una área más extensa de daño en el hospedero. Las enzimas hidrolíticas también proveen a la bacteria de fuentes de carbono y energía rompiendo los polímeros del hospedero en azúcares y aminoácidos de bajo peso molecular. A pesar del hecho de que las enzimas hidrolíticas producidas por bacterias causan daño a los tejidos, dichas enzimas no son clasificadas como toxinas porque generalmente no matan a las células del hospedero o no causan un daño metabólico identificable como el producido por la toxina colérica. La virulencia de algunos microorganismos es debido en parte a la producción de enzimas u otros factores metabólicos. Entre las principales enzimas metabólicas relacionadas con la virulencia de las bacterias patógenas se encuentran:

- a) Colagenasa, enzima que desintegra el colágeno, encontrada en músculo, hueso y cartílago, favoreciendo la diseminación.
- b) Coagulasa, enzima capaz de coagular el plasma, lo que facilita el depósito de fibrina, impidiendo una fagocitosis adecuada.
- c) Hialuronidasa, enzima inducible en presencia de su sustrato específico, que hidroliza el ácido hialurónico (cemento intercelular). Esto facilita la diseminación de los

microorganismos en el hospedero y se le llama también "factor de diseminación".

d) Leucocidinas, sustancias producidas por algunas bacterias, son capaces de lisar a leucocitos polimorfonucleares

e) Hemolisinas, producidas por diversas bacterias, que lisan los eritrocitos. Se les relaciona con la virulencia debido a que las cepas hemolíticas de un patógeno en general son más virulentas que las no hemolíticas.

f) Lecitinasas, también conocida con el nombre de alfa-toxina, destruye varios tipos de células, en particular eritrocitos.

g) Fibrinolisisina, disuelve la fibrina humana pero no la de otras especies animales. Como ejemplo se puede citar la estreptocinasas producida por los grupos A, B, y C del Streptococcus β -hemolítico.

FACTORES QUE CAUSAN DAÑO AL HOSPEDERO	
Factor	Comentario
Exotoxinas	
Colérica	Activa la adenilato ciclasa y aumenta el cAMP intracelular
Tetánica	Inhibe los neurotransmisores en la placa neuromuscular
Diftérica	ADP-ribosila el factor de elongación, causan muerte celular
Shiga	Inactiva los ribosomas 60s produciendo muerte celular
Endotoxinas	Pirogénicas e inducen la producción de citocinas proinflamatorias
Peptidoglucano	Forman la pared de bacteria grampositivas y gramnegativas

ácido teicoico	Sólo en bacterias grampositivas y funciona como adhesina
----------------	--

Sistemas de secreción de las bacterias.

Diferentes bacterias gramnegativas patógenas han desarrollado complejas maquinarias para transferir proteínas codificadas en su cromosoma a células eucariontes y se conocen como sistemas de secreción de proteínas. Se han descrito cuatro sistemas de secreción principales (sistemas de secreción tipos II, III, IV y V). Debido a que las proteínas bacterianas liberadas modulan varias funciones celulares, reciben el nombre de proteínas efectoras, término que se aplica solo a moléculas que requieren maquinarias de multi-proteínas especializadas para ser liberadas en la célula eucarionte.

Los sistemas de secreción se expresan en especies bacterianas como *Salmonella* entérica, *Shigella*, *Chlamydia*, *Yersinia* y *Escherichia coli*.

Sistema de secreción tipo II (TTSS II). Este tipo utiliza el sistema Sec para transportar proteínas del citoplasma al espacio periplásmico, mediante otras proteínas llamadas secretinas; atraviesan la membrana citoplasmática (interna) y la membrana externa para alcanzar el medio externo.

Sistema de secreción tipo III (TTSS III) Este sistema se describe como una jeringa molecular, por medio de la cual la bacteria inyecta diferentes proteínas a la célula hospedera. El TTSS III consiste en una maquinaria de más de 20 proteínas. Este sistema lo utilizan *Escherichia coli* enteropatógena y enterohemorrágica, entre otras.

Sistema de secreción tipo IV (TTSS IV) El TTSS IV es un sistema homólogo a la maquinaria de la conjugación bacteriana y puede transportar tanto DNA como proteínas. Este sistema lo usa *Helicobacter pylori* para transferir la proteína CagA dentro de las células gástricas. También *Bordetella pertussis* secreta su toxina por ese mecanismo.

Sistema de secreción tipo V (TTSS V) A este sistema se le conoce como sistema autotransporte, aunque también utiliza el sistema Sec para cruzar la membrana externa; las bacterias que usan este sistema forman una estructura beta barril en su extremo carboxilo, el cual se inserta en la membrana externa y permite al resto del péptido (péptido señal), llegar al medio externo.

Sistema de secreción tipo VI (T6SS) Se piensa que consiste en dos complejos principales, en asociación con elementos citoplásmicos: un ensamble asociado a la membrana, que incluye dos proteínas que son homólogas a elementos del sistema de secreción IV. (Russell et al., 2014).

Postulados de Koch:

El microorganismo debe encontrarse en todos los pacientes con la enfermedad en cuestión y su distribución en el cuerpo debería corresponder a las lesiones observadas.

El microorganismo debe aislarse de las lesiones de una persona infectada y obtener un cultivo puro.

El cultivo puro inoculado en animales experimentales debe producir la enfermedad. El microorganismo deberá aislarse en un cultivo puro a partir del animal infectado intencionalmente.

Versión molecular de los postulados de Koch:

1) El gene (o su producto) debe encontrarse en cepas bacterianas que causan la enfermedad y no en bacterias que no son virulentas.

2) La inactivación específica del gene o los genes asociados a virulencia deben conducir a una pérdida de la patogenicidad o virulencia.

2A) Alternativamente, la introducción del gene clonado en una cepa avirulenta debe convertirla en cepa virulenta.

3) Debe demostrarse que el gene asociado a virulencia sea expresado por la bacteria cuando está en algún animal experimental en cualquier etapa del proceso infeccioso. Los anticuerpos dirigidos contra el producto del gene deben ser protectores para el hospedero, el producto del gene debe inducir una inmunidad protectora.

2.6 Flora microbiana

La flora humana normal es el conjunto de gérmenes que conviven con el huésped en estado normal, sin causarle enfermedad. Su composición es característica para la especie humana, tanto en los gérmenes que la componen como en su número y distribución en el organismo. Sitios colonizados y sitios estériles: La flora normal coloniza las superficies cutáneomucosas. Por otro lado, en el organismo existen sectores que son estériles en condiciones normales: por ejemplo, pleura, meninges, cavidad peritoneal, pericardio, etc. Esto debe ser tenido en cuenta al realizar un estudio microbiológico. Las técnicas empleadas para obtener una muestra de un sitio con flora son diferentes a las de los sectores que no la tienen. También son diferentes los medios de cultivo que se emplearán para sembrar esas muestras (que requerirán a menudo de medios que inhiban la flora normal) y la interpretación de los cultivos. Por ejemplo, el aislar un germen del líquido cefalorraquídeo es siempre patológico si se tomaron las precauciones para no contaminar la muestra; en cambio, en un exudado faríngeo se aislarán diversos gérmenes y se deberá valorar en forma cuidadosa cuales son habitantes normales de ese sector y cuáles no. Flora basal y flora transitoria: La flora basal es la característica de cada sector del organismo y está constituida por gérmenes que siempre están presentes en ese sector. Por ejemplo: *Staphylococcus epidermidis* en la piel o *E. coli* en el intestino. En cambio, la flora transitoria es variable de un ser humano a otro y está compuesta por gérmenes que colonizan en forma intermitente un determinado sector. Esta flora transitoria puede incluir bacterias potencialmente patógenas para el propio individuo u otras personas que entran en contacto con él. Importancia de la flora normal: La flora humana normal desde diversos puntos de vista representa un importante mecanismo de defensa del huésped. Contribuye al desarrollo de la respuesta inmunológica, como ha sido demostrado en modelos animales que nacen y son criados en condiciones de esterilidad (individuos axénicos). Estos animales presentan un pobre desarrollo de los diversos componentes de su sistema inmunitario. La flora además ayuda a evitar la colonización de la piel o las mucosas por bacterias que pueden ser patógenas. Los gérmenes para iniciar la infección deben, en general, comenzar por colonizar los epitelios. Allí seguramente compiten con los integrantes de la flora por factores tales como receptores celulares y nutrientes.

IMPORTANCIA DE LA FLORA NORMAL

Efectos directos Producción de bacteriocinas

Producción de metabolitos tóxicos

Reducción del potencial redox

Consumo de nutrientes esenciales

Competencia por receptores

Efectos indirectos Aumento de la producción de anticuerpos.

Estímulo de la fagocitosis

Aumento de la producción de interferón.

De conjugación de ácidos biliares.

2.7 Enfermedades bacterianas

Enfermedades causadas por bacterias

Botulismo

Esta enfermedad está causada por la bacteria *Clostridium botulinum*.

Las bacterias podrían acceder al organismo a través de heridas o podrían habitar en alimentos que hayan sido mal enlatados o mal conservados.

Una vez incubada los síntomas que se podrían originar son:

Cólicos abdominales.

Dificultad respiratoria que puede llevar a una insuficiencia respiratoria.

Dificultad al deglutir y al hablar.

Visión doble.

Náuseas.

Vómitos.

Debilidad con parálisis (igual en ambos lados del cuerpo).

Se transmite por:

Heridas.

Alimentos mal enlatados o conservados.

Tratamiento:

Se cura con un medicamento para combatir la bacteria (antitoxina botulínica).

Cólera

Esta enfermedad está causada por la bacteria Vibrio cholerae.

Raramente, el cólera es transmitido por contacto persona a persona.

Los síntomas son:

Vómitos.

Diarrea.

Deshidratación.

Se transmite por:

Alimentos y aguas contaminadas.

Vacuna:

Nombre: BS-WC.

La pauta habitual para la vacunación sería:

Una dosis de 50ml en niños de 2 a 5 años.

Una dosis de 100ml en mayores de 5 años.

Impétigo

Esta enfermedad está causada por la bacteria Estreptococo.

Una vez incubada los síntomas que se podrían originar son:

Una o más ampollas llenas de pus, fáciles de reventar.

Ampolla con picazón, supuración y formación de costra.

Erupción que puede comenzar como un solo punto, pero que se disemina a otras áreas con el rascado.

Lesiones cutáneas en la cara, los labios, los brazos o las piernas que se propagan a otras áreas.

Ganglios linfáticos inflamados cerca de la infección.

Se transmite por:

Mordeduras de animales.

Mordeduras humanas.

Lesión o traumatismo en la piel.

Picaduras de insectos.

Tratamiento:

Se cura con cremas antibacterianas y antibióticos.

Lepra

Esta enfermedad está causada por la bacteria *Mycobacterium leprae*.

La enfermedad afecta principalmente la piel, los nervios periféricos, la mucosa de las vías respiratorias altas y los ojos.

Una vez incubada los síntomas que se podrían originar son:

Insensibilidad en la piel y al dolor.

Aclaramiento de la piel.

Parálisis muscular.

Fragilidad en los huesos.

Se transmite por:

Contacto entre una persona enferma y otra sana a través de las vías aéreas superiores o la piel.

Tratamiento:

Se cura con antibióticos.

Meningitis bacteriana

Esta enfermedad está causada por la bacteria *Neisseria meningitidis*.

Se trata de una infección bacteriana de las membranas que cubren el cerebro y la médula espinal (meninges). Contraer esta enfermedad se trataría de una emergencia y se necesitará tratamiento inmediato en un hospital.

Los síntomas por lo general aparecen rápidamente y pueden abarcar:

Fiebre y escalofríos.

Cambios en el estado mental.

Náuseas y vómitos.

Sensibilidad a la luz.

Dolor de cabeza con mucha intensidad.

Rigidez en cuello.

Disminución del estado de conciencia.

Respiración rápida

Se transmite por:

Infecciones virales que generalmente mejoran sin tratamiento.

Irritación química.

Alergias a medicamentos.

Hongos.

Parásitos.

Tumores.

Neumonía bacteriana

Esta enfermedad está causada por la bacteria *Streptococcus pneumoniae*.

Una vez incubada los síntomas que se podrían originar son:

Fiebre.

Resfriado.

Tos.

Dolor en el pecho.

Dificultad respiratoria.

Temblores.

Se transmite por:

El aire (tos, estornudos).

Por el contacto cercano con una persona que es portadora o asintomática, es decir, que no está enferma pero tiene la bacteria en su organismo y puede transmitirla a personas susceptibles y vulnerables.

Vacuna:

Nombre: PPSV (Vacuna antineumocócica de polisacáridos).

- Pneumococcal.

- Polysaccharide.

- Vaccine.

La pauta habitual para la vacunación sistemática actualmente es:

Por lo general se necesita una sola dosis de la PPSV, pero en algunas circunstancias se puede poner una segunda dosis.

Es recomendable para mayores de 65 años.

En personas de 2 a 64 años sólo es recomendable en determinados casos.

Tétanos

Esta enfermedad está causada por la bacteria *Clostridium tetani*.

Cuando la toxina se extiende por el cuerpo, provoca violentos espasmos en cuello, brazos, piernas y abdomen.

Una vez incubada los síntomas que se podrían originar son:

Dolor de cabeza.

Fiebre.

Contracturas.

Espasmos musculares.

Se transmite por:

Heridas, especialmente si son heridas profundas, con mucha destrucción de tejidos, heridas sucias, o contaminadas que tardan en ser atendidas, congelaciones, quemaduras...

Intervenciones quirúrgicas de abdomen y miembros inferiores.

Pinchazos accidentales.

Uso de drogas inyectadas.

Cortes o pinchazos con metales.

En el tétanos neonatal la puerta de entrada es la cicatriz umbilical.

Vacuna:

Nombre: DTPa.

- Difteria
- Tétanos
- Pertussis
- acelular

No hay disponible una vacuna concreta anti-tos ferina, sino siempre combinada con la antidiftérica y la antitetánica.

Tos ferina

Esta enfermedad está causada por la bacteria *Bordetella pertussis*.

Suele afectar a personas de cualquier edad, aunque aparece normalmente en niños.

Los síntomas son muy parecidos a los de un resfriado:

- Tras una incubación de 7-14 días aparecen los síntomas clínicos, que se inician con una fase catarral:

Congestión.

Secreción nasal

Y tos discreta.

- La sigue la fase paroxística, en la que hay tos creciente de manera sofocante, sin pausas para tomar aire entre los golpes de tos (tos "quintosa"), acabando las crisis con un sonido especial inspiratorio ("gallo").

- Y a menudo vómito.

Se transmite por:

Vía respiratoria.

Secreciones, tos y estornudos a partir de los sujetos infectados.

Vacuna:

Se dispone de vacuna antitetánica sola (T) y combinada con otras vacunas:

Nombre: T (Tétanos).

En adolescentes y adultos se tiende a sustituir la antitetánica sola (T) por la Td:

Nombre: Td.

- Tétanos.

- difteria.

* En menores de 7 años siempre se emplean vacunas combinadas DTP:

Nombre: DTP.

- Difteria.

- Tétanos.

- Pertussis (tos ferina)

La pauta habitual para la vacunación en menores de 7 años sería:

Una dosis a los 2, 4 y 6 meses.

Un refuerzo a los 18 meses.

Un recuerdo a los 4-6 años.

Tuberculosis

Esta enfermedad está causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Esta bacteria afecta principalmente a los pulmones.

Una vez incubada los síntomas que se podrían originar son:

Tos persistente, a veces con sangre o esputo.

Dolor en el tórax.

Debilidad o cansancio, pérdida de peso, falta de apetito.

Fiebre, escalofríos, sudoración nocturna.

Se transmite:

La infección se transmite de persona a persona a través del aire.

Vacuna:

Nombre: BCG.

- Bacillus.

La vacuna contra la tuberculosis (vacuna BCG) se fabrica con bacilos vivos atenuados de una cepa de *Mycobacterium bovis*.

La pauta habitual para la vacunación es:

Países en desarrollo con altas tasas de infección.

Niños no infectados previamente en zonas con riesgo anual de adquirir la infección.

Niños de grupos de riesgo en países desarrollados.

Bacterias causantes de enfermedades

Neumococo

El hábitat natural del neumococo suele ser la garganta y la nariz aunque este puede alojarse en cualquier parte del organismo.

Dependiendo del lugar donde se sitúe el microorganismo causará diferentes tipos de enfermedades y de ahí sus diferentes síntomas para cada una de ellas.

Algunas de estas enfermedades junto con sus síntomas son:

Meningitis. Elevada fiebre, somnolencia y vómitos muy característicos.

Neumonía. Temblores, resfriado, tos, fiebre y congestión de pecho.

Otitis. Dolor de cabeza, fiebre y dolor de oídos.

Sinusitis. Fiebre, mucosidad y tos.

Artritis, osteomielitis, endocarditis, peritonitis, celulitis, etc.

Esta bacteria se transmite por:

El aire (tos, estornudos).

Por el contacto cercano con una persona que es portadora o asintomática, es decir, que no está enferma pero tiene la bacteria en su organismo y puede transmitirla a personas susceptibles y vulnerables.

Haemophilus influenzae tipo B (Hib)

Se transmite por:

Vía respiratoria.

Por la tos.

Estornudos

O simplemente el aire.

Vacuna:

La Hib es una de las vacunas infantiles recomendadas y, por lo general, los estados exigen prueba de que el niño la haya recibido antes de ingresar a la guardería o al preescolar.

Se debe administrar una dosis a cada una de las siguientes edades:

2 meses.

4 meses.

6 meses.

12 a 15 meses.

Los niños mayores de 5 años y los adultos no necesitan recibir la vacuna contra el Haemophilus Influenzae tipo b, a menos que presenten ciertas afecciones, entre las que se pueden mencionar VIH, enfermedad drepanocítica y algunas otras.

UNIDAD III

Micología

3.1 Generalidades sobre hongos de interés médico

3.2 Biología de hongos microscópicos

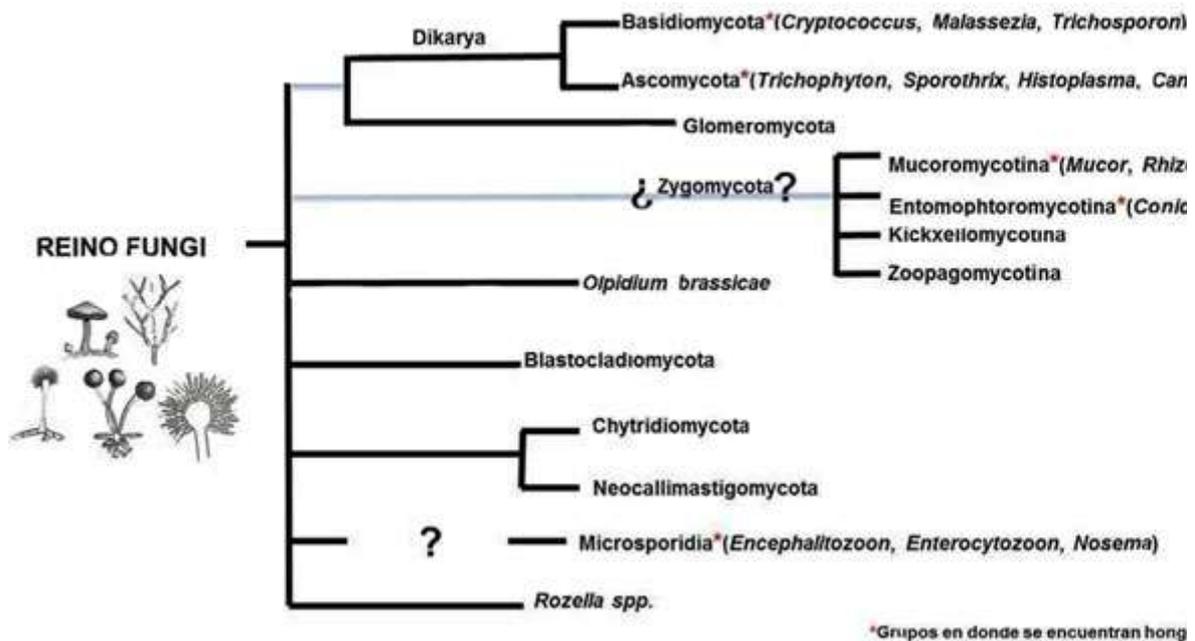
La Micología es la rama de la Biología que tiene por objetivo el estudio de los hongos. Con algunas excepciones, los integrantes del reino Fungi poseen las siguientes características: Son eucariontes, aerobios, macro o microscópicos, heterótrofos, la nutrición la efectúan mediante la secreción de enzimas (exoenzimas) que digieren la materia orgánica antes de ingerirla (absorción) y es almacenada en forma de glucógeno, poseen crestas mitocondriales en placa, membrana celular constituida por ergosterol, quitina como principal componente de la pared celular, la síntesis de la lisina la efectúan por el intermediario ácido alfa-amino-adípico (AAA) y se reproducen por propágulos denominados esporas.

Todas esas características contribuyen a que los hongos se encuentren o invadan hábitats muy diversos (son organismos ubicuos) y cumplan una de las funciones más importantes en el ecosistema que es la degradación de material orgánico.

Se han descrito alrededor de 70 000 especies de hongos, pero se considera que puede haber 1.5 billones de ellas (Hawksworth et al., 1995). De toda esta gran biodiversidad, aproximadamente el 10% constituye el grupo de hongos estudiados dentro de la Micología Médica.

La taxonomía de los hongos que producen enfermedad en el humano ha cambiado, en gran medida debido al rápido desarrollo de técnicas de secuenciación de DNA. El número de especies de hongos potencialmente patógenos ha aumentado de manera importante. Muchas de estas especies forman parte de complejos, y muestran entre ellas diferencias en virulencia y respuesta al tratamiento, por lo que es necesaria la identificación para el manejo adecuado de los pacientes. (Guarro. 2012).

Clasificación actual de los Hongos



Fuente: Laura Rosio Castañón. "Generalidades e Importancia de la Micología Médica". Presentación PowerPoint de gran utilidad...

Morfología.

Son unidades anatómicas y de crecimiento: la hifa, en hongos pluricelulares (Fig. 1), y la levadura, en hongos unicelulares (Fig. 2).

- Las hifas son estructuras cilíndricas, cenocíticas (aseptadas) o tabicadas (con septos), generalmente multinucleadas. Crecen por el ápice (elongación) y pueden hacerlo en cualquier dirección, incluso dentro del sustrato (Fig. 3). Un conjunto de hifas se denomina micelio y cuando alcanzan cierto tamaño se dice que forma colonias (Fig. 4).
- Las levaduras (Fig. 2) presentan formas diversas, esférica, ovoide, elipsoidal y cilíndrica; crecen de forma isodiamétrica (por todos lados) constituyendo la parte vegetativa y en poco tiempo se reproducen asexualmente por gemación, fisión binaria o fragmentación. Algunas levaduras forman cadenas, estructuras a las que se denomina pseudohifas (por lo que la agregación de varias de ellas se conoce como pseudomicelio). (Fig. 3). Las colonias generalmente son poco elevadas y de consistencia suave, cremosa, y su color oscila, en general, entre el blanco - amarillo, aunque algunas contienen pigmentos carotenoides (Fig. 4).

En la Micología Médica se consideran los hongos dimórficos. Habitualmente, en estos casos, se identifica una forma infectiva, y una forma parasitaria, la primera presente en la naturaleza, la segunda en el hospedero.

Reproducción.

Los hongos, durante la fase vegetativa (de nutrición y crecimiento), son haploides (n) en la mayor parte de su ciclo de vida. El micelio vegetativo crece dentro o sobre el sustrato y absorbe los nutrientes; desarrolla hifas aéreas, las cuales generalmente constituyen la porción más visible de la colonia, y en las que se diferencian hifas fértiles, que son reproductivas y formadoras de esporas.

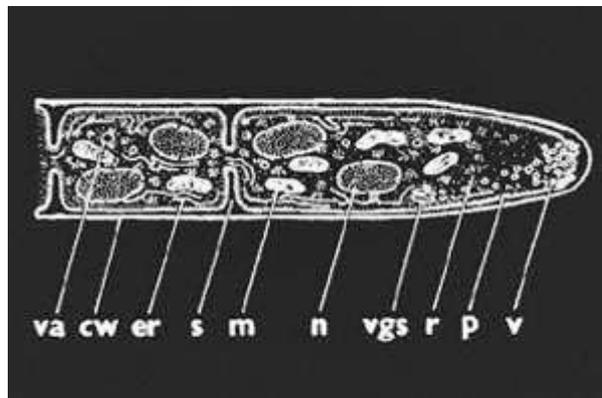


Fig. 1. Estructura de hifa. Va= vacuolas; pc= pared celular; re= retículo endoplásmico; s= septum; m= mitocondria; n= núcleo; vgs= Golgi; r= ribosoma; p= membrana plasmática; v= vesículas. CDC

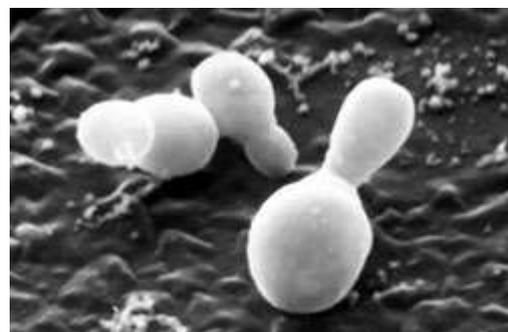
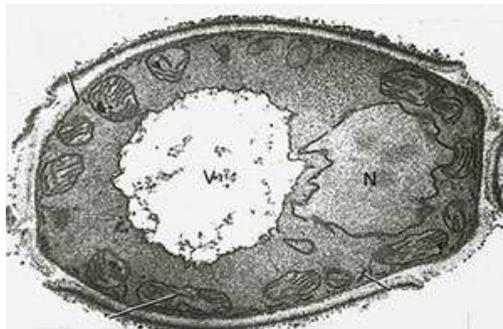


Fig. 2. Estructura de una levadura. Candida sp. TEM. CW= pared celular; N = núcleo; Malassezia furfur SEM. Imágenes: CDC.

P = m. plasmática; M= mitocondria; V= vacuola.

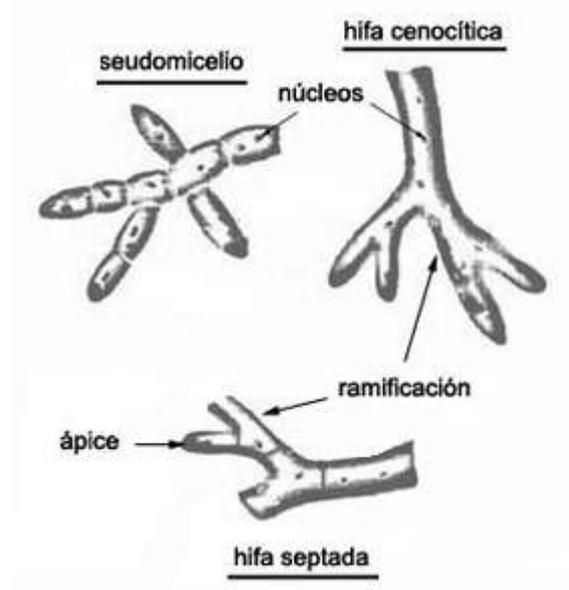


Fig. 3. Tipos de hifa. T. Uribarren B.

El ciclo de vida inicia con la germinación de una de las esporas, prosigue con el crecimiento en un sustrato, aumenta la biomasa, y termina nuevamente con la esporulación y la diseminación de los propágulos.

La reproducción puede ser asexual (mitosis) o sexual (meiosis), y pueden presentarse simultáneamente. La reproducción sexual inicia con la plasmogamia (fusión de membranas) de dos gametos haploides; se acercan los núcleos y posteriormente ocurre la cariogamia, formando el cigoto diploide ($2n$) y finalmente ocurre la meiosis para reestablecer la condición haploide; así que 2 núcleos haploides darán lugar a 4 nuevos núcleos recombinados haploides. Esta recombinación genética proporciona grandes ventajas para invadir o resistir en ambientes desfavorables. Algunas especies pueden “retardar” el proceso de meiosis y permanecer en una condición dicariótica ($n+n$), una forma de resistir condiciones desfavorables. De forma esquemática podríamos escribir: Fase vegetativa haploide --- plasmogamia --- cariogamia --- meiosis --- esporas haploides --- fase vegetativa haploide. Dependiendo del

phylum del hongo, las esporas sexuales son producidas en estructuras especializadas como ascas o basidios y son denominadas: Cigosporas, ascosporas o basidiosporas.

Por otra parte, la reproducción asexual solamente incluye: fase vegetativa heteroploide (n , $2n$, $4n$) --- mitosis—esporas heteroploides --- fase vegetativa heteroploide. La ventaja de este tipo de reproducción es el gran número de esporas que se forman, así como la rapidez con que se lleva a cabo el proceso. Los hongos filamentosos pueden reproducirse por la simple fragmentación de las hifas o mediante la formación de estructuras especializadas (células conidiógenas o esporangios), mientras que las levaduras se reproducen por gemación, fisión binaria o fragmentación. Las esporas de origen asexual se agrupan en: Conidios y esporangiosporas.

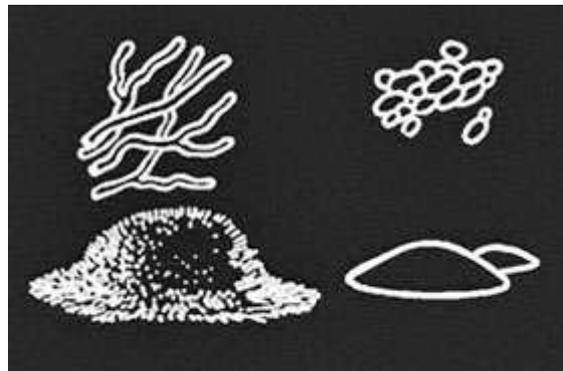


Fig. 4. Colonias filamentosas y levaduriformes.

Factores de virulencia de los hongos.

El curso de las enfermedades micóticas, lo determina la interacción del agente con los diferentes mecanismos de defensa naturales y específicos del huésped. Las esporas o fragmentos de micelio de un hongo patógeno, pueden permanecer latentes o germinar sobre la superficie del huésped o si son inhaladas, en los alveolos de los pulmones, las hifas resultantes pueden penetrar los tejidos, colonizarlos, reproducirse y dispersarse, alterando la fisiología del huésped y causando enfermedad. En el humano, los sistemas de defensa generalmente son efectivos, ya que la mayoría de los hongos que están en el ambiente, no causan enfermedad. El sistema inmune de los mamíferos involucra factores tanto innatos (complemento, fagocitosis, procesos inflamatorios, quimiotaxis) como adaptativos (células y anticuerpos específicos), cuya

principal función es mantenernos limpios de agentes infecciosos; sin embargo, existen situaciones que debilitan esas defensas naturales o adquiridas, haciendo susceptible al huésped.

Los factores de virulencia serán aquellas “propiedades”, generalmente moléculas, que permiten al hongo causar daño o enfermedad en quien lo hospeda. El desarrollo o expresión de tales factores, comienza por estímulos externos a la célula fúngica. Esos estímulos activan cascadas de señalización que provocan compuestos protectores (p. ej: enzimas, determinantes antigénicos, receptores), causantes a su vez del desarrollo de la patogénesis. Existe una compleja red de interacciones que incluyen la participación de muchas moléculas, tanto por parte del huésped como del hongo, que permiten la expresión de diversas vías; el resultado de esa interacción, será evaluado (enfermedad o no) según el nivel de daño causado en el huésped.

3.3 Tipos de micosis

Agente	Enfermedad	Factor de virulencia	Efecto
Aspergillus sp.	Aspergilosis	“rodlets” (hidrofobinas)	Inhibición de la fagocitosis
Aspergillus sp.	Aspergilosis pulmonar	Gliotoxina	Alentan el movimiento ciliar y lesionan el epitelio de vías respiratorias altas.
Dermatofitos	Tiñas	Queratinasas	Destrucción del estrato córneo
Dermatofitos	Ides	Toxinas	Hipersensibilidad
Cryptococcus	Criptococosis	Cápsula	Inhibición de respuesta inmune (impide migración de células de la inmunidad y propiedades antifagocíticas)

Cryptococcus	Criptococosis	Producción de melanina	Anti-oxidante, resistencia a anfotericina B
Sporothrix spp.	Esporotricosis linfangítica	Producción de melanina	Inhibe la fagocitosis por macrófagos.
Mucorales	Mucormicosis	Ceto-reductasa	Degradan los cuerpos cetónicos presentes en sangre, favoreciendo el crecimiento y diseminación del hongo.
Malassezia spp.	Pitiriasis versicolor hipocrómica	Ácidos dicarboxílicos	Inhibición de la tirosinasa y de la producción de melanina conllevando una menor protección contra los rayos UV y el establecimiento de agentes microbianos dañinos.
Malassezia spp.	Dermatitis seborréica	Fosfolipasas	Destrucción de los ácidos grasos esenciales en la piel causando sequedad
Coccidioides spp.	Coccidioidiomycosis	Elastasas	Destruyen las fibras elásticas de los tejidos.

LO BUENO Y LO MALO

Los hongos producen metabolitos secundarios y el hombre los procesa para diferentes industrias como: panadería, cervecera, quesera, en la producción de antibióticos (penicilinas, cefalosporinas), inmunodepresores (ciclosporina), hormonas y esteroides, ácidos orgánicos (ácido láctico y el ácido cítrico empleado en la elaboración de un refresco de gran consumo), enzimas (celulasa, catalasa, amilasa, renina). *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura valiosa no únicamente por su valor comercial sino como sistema modelo en estudios de genética eucariota.

Los hongos simbiotes tienen relaciones beneficiosas con otros organismos. Ejemplos de esto son los líquenes, asociaciones de hongos con algas o cianobacterias cuya relación íntima les permite colonizar diferentes sustratos, incluso rocas, que de manera independiente son incapaces de degradar y las micorrizas, asociaciones de hongos y raíces de plantas cuya interacción favorece el crecimiento de la planta y la obtención de nutrientes por parte del hongo en suelos que les son desfavorables. También presentan relaciones simbióticas con insectos, como las hormigas y termitas.

Los hongos tienen un papel esencial en la descomposición de la celulosa, con la producción de bióxido de carbono y agua; por otra parte, representan pérdidas económicas al degradar papel, telas, cuero, hidrocarburos y otros productos; el aspecto útil es su responsabilidad en el reciclaje de la madera en los bosques y su empleo para la bioremediación de suelos contaminados por materiales tóxicos. Degradan casi todo, con excepción de algunos plásticos y pesticidas.

Por otra parte, son causa de pérdidas económicas en la producción agrícola y ganadera debido a las enfermedades que causan a animales y plantas.

IMPORTANCIA EN LA MEDICINA

Los hongos pueden causar en el humano: Hipersensibilidad (alergias), infecciones (micosis) e intoxicaciones (micotoxicosis y micetismos).

Las alergias por hongos son padecimientos causados por una reacción de hipersensibilidad del humano hacia esporas o fragmentos de hifas (alérgenos fúngicos). Los cuadros clínicos presentados son cutáneos o gástricos, pero los más comunes son de origen respiratorio.

En general, las micotoxicosis se adquieren por consumir alimentos de origen vegetal (especialmente semillas y granos de leguminosas y oleaginosas), sobre los cuales hongos filamentosos crecieron, contaminando al vegetal con metabolitos tóxicos o micotoxinas (producto del crecimiento natural sobre el sustrato). La identificación de micotoxinas en granos almacenados para consumo humano o para animales implica su desecho.

Los micetismos o ingestión de ciertos macromicetos por recreación, equivocación o con objeto de tener una "experiencia mística" es origen de severas intoxicaciones (micetismo).

Las infecciones de origen fúngico se denominan micosis (superficiales, cutáneas, subcutáneas, sistémicas, oportunistas).

La adquisición de una micosis, depende a menudo de factores predisponentes, tales como edad, ocupación, embarazo, quemaduras, inmunodepresión, quimioterapia, radiación, uso de catéteres, procesos malignos o enfermedades metabólicas en las personas. Las formas infectantes se adquieren habitualmente del ambiente, ya sea por contacto directo (dermatofitos) por inhalación (p. Ej: Coccidioides) o lesiones de continuidad (Sporothrix). Otras, se pueden contraer o provienen de la microbiota normal, como sucede en la micosis oportunista ocasionada por Candida.

CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LAS MICOSIS		
Tipos	Enfermedad	Hongo (Género)
Superficial: Capas externas de piel (epidermis), cabello, uñas, mucosas	Pitiriasis versicolor Tiña negra Dermatofitosis	Malassezia Hortaea Trichophyton Microsporum Epidermophyton
Subcutáneo: Dermis, tejido subcutáneo y músculo	Eumicetoma Esporotricosis Cromoblastomicosis	Madurella Sporothrix Fonsecaea
Sistémico o profundo: Uno o más órganos / tejidos profundos	Histoplasmosis Paracoccidiomicosis Coccidiomicosis	Histoplasma Paracoccidioides Coccidioides
Oportunista: Diversos órganos. Topográficamente pueden ser superficiales, subcutáneas o sistémicas, pero son causadas por hongos inocuos	Candidosis Criptococosis Zigomicosis	Candida Cryptococcus Rhizopus

<p>En un sujeto susceptible, cualquier hongo puede ser un oportunista</p>		
---	--	--

Las respuestas tisulares más frecuentes que inducen los hongos, cuando causan una micosis son:

- Inflamación aguda supurativa
- Inflamación crónica
- Inflamación granulomatosa

Algunos ejemplos:



Fotografía 1 -Onicomycosis. Dr. Rubén López Martínez, UNAM.

Fotografía 2 - Micetoma. Dr. Luis Javier Méndez Tovar, UNAM.

Fotografía 3 - Coccidioidomycosis. Dra. Laura Rosio Castañón Olivares, UNAM.

Fotografía 4 - Queilitis por Candida. CDC.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por diversos hongos filamentosos. Son ubicuos en la naturaleza; se han identificado en leche, carne, granos.

Los hongos que las producen crecen en un amplio rango de sustratos y de condiciones ambientales. Causan severos problemas en la agricultura: Se estima que alrededor del 25% de las cosechas a nivel mundial se estropea a causa de micotoxinas, en el campo, durante el almacenaje y/o en el proceso de distribución.

3.4 Pseudomicosis

Las micotoxinas también se encuentran en los espacios de edificios enmohecidos, y son responsables en parte del "Síndrome del edificio enfermo". Cualquiera que sea la ruta de contaminación: ingestión de alimentos contaminados, inhalación de esporas, contacto dérmico, las micotoxinas constituyen un problema severo para la salud humana y de gran número de animales. Expertos en la asesoría sobre riesgos de contaminantes consideran a las micotoxinas como un factor de riesgo alimentario crónico de mayor importancia que los contaminantes sintéticos, las toxinas de plantas, los aditivos alimenticios o residuos de pesticidas. (Prieto-Simón B, 2007).

La exposición a las aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 y M1, entre ellas), producidas por hongos de los géneros *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, sobre todo, frecuentes en cacahuates y maíz (en la Unión Europea se consideran niveles máximos residuales 4 µg/kg, y 15µg/kg de acuerdo a The Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme) se asocia a daño hepático y renal, mutagénesis, teratogénesis, carcinogénesis, inmunosupresión y citotoxicidad. Entre las características de estas toxinas se encuentran su capacidad de bioconcentración, bioacumulación y gran estabilidad. En México, la nixtamalización tradicional elimina una gran proporción de aflatoxinas. Desafortunadamente, el maíz no es sujeto a estos procesos en la elaboración de harinas, cereales, aditivos alimenticios y otros. (Guzmán-de-Peña D, Peña-Cabriales JJ. 2005). En un estudio reciente, se encontró que una de cada cinco tortillas está contaminada con aflatoxinas (Carvajal-Moreno, Gaceta UNAM, 23 abril 2012).

Por lo que respecta a los niveles máximos tolerados por distintos países para aflatoxinas totales, estos oscilan de manera alarmante. En la Unión Europea se contemplan 4 partes por billón (ppb) de aflatoxinas totales (AFB1, AFB2, AFG4, AFG2 - la suma), en tanto que en la India el máximo aceptado es 30 ppb y en Rusia 700 ppb. (Trombete et al., 2013).

Las normas oficiales en México establecen niveles de aflatoxinas totales de 20 ppb.

Además, la zearalenona y sus metabolitos, micotoxina producida por el hongo *Fusarium gramineum*, contaminante de una gran variedad de granos de consumo humano, con

efecto hiper-estrogénico, se ha encontrado en altos porcentajes en México, cuando se le ha buscado. Hacen falta estudios sobre los riesgos y la implementación de medidas para evitar la contaminación. (Briones D, et al. 2007).

Las ocratoxinas son un grupo de toxinas producidas por varias especies de hongos, en especial por géneros de *Aspergillus* y *Penicillium*. El potencial de contaminación, en productos alimenticios de consumo humano y en alimentos para animales, es muy alto. Se considera que la ocratoxina A es la más tóxica y frecuente. Los principales órganos afectados en el humano son los riñones, seguidos del hígado, bazo y huesos. En México, se carece de información actualizada.

3.5 Relación entre enfermedades microbiológicas y la presencia de protozoarios

Los protozoos

Los protozoos son microorganismos unicelulares, eucariotas y heterótrofos, que carecen de pared celular. Tienen capacidad de desplazamiento, sensibilidad ante diferentes estímulos y el modo de capturar el alimento y su metabolismo son similares a los animales. Los protozoos viven en ambientes acuáticos o terrestres muy húmedos y generalmente tienen vida libre. Poseen pseudópodos o cilios y flagelos para desplazarse.

Interés de los protozoos.

Beneficios:

- En los medios acuáticos: aparte de las formas fotosintéticas que juegan un papel importante como productores primarios, base de las redes alimentarias, la importancia de los protozoos heterótrofos radica en ser un paso intermedio entre niveles tróficos, cuestión de gran importancia en los procesos de depuración de las aguas.
- Son considerados como bioindicadores en el proceso de tratamiento de aguas residuales.
- Son los principales organismos consumidores de bacterias en los medios acuáticos. Con ello consiguen, por un lado, un crecimiento óptimo de poblaciones bacterianas manteniendo una tasa de aclarado que favorece que dichas poblaciones no colapsen, excretando al mismo tiempo sustancias minerales que favorecen el crecimiento de dichas

bacterias y, también, disminuyen con dicho consumo, la concentración de bacterias patógenas y fecales del medio, clarificando el agua de forma eficiente.

Perjuicios:

El principal perjuicio es que provoca enfermedades a los seres humanos. A continuación se citan algunas:

- Enfermedad del sueño: Es provocada por el protozoo *Trypanosma brucei* transmitido por la mosca tsé-tsé. Infecta vasos sanguíneos y pueden invadir el sistema nervioso central, causando inflamación del tejido cerebral y medular.
- Enfermedad de Chagas producida por *Trypanosma cruzi* y transmitida por las chinches.
- Malariao paludismo: El mosquito *Anopheles* es un vector biológico, que transmite varias especies del protozoo *Plasmodium*, causante de la enfermedad. Se infectan las células hepáticas y eritrocitos sanguíneos.

3.6 Generalidades sobre los protozoarios de interés médico.

Del nombre y algunas características generales Los protozoos son células eucariotas simples (organismos cuyas células tienen membrana nuclear) con características del reino animal, ya que son móviles y heterótrofos. El nombre, que proviene del griego proto: primero y zoo: animal, avala la hipótesis de que son los seres vivos más antiguos, que fueron las primeras células que existieron. Debido a su tamaño pequeño y a la producción de quistes que les permiten resistir a las condiciones medioambientales adversas, muchas especies son cosmopolitas (Cairns y Ruthven, 1972), mientras que otras son de distribución limitada. Características generales resumidas Pequeños, unicelulares, algunos forman colonias con pocos o numerosos individuos todos iguales; sin simetría o con simetría bilateral, radial o esférica. Forma celular generalmente es constante, ovalada, alargada, esférica u otra, en algunas especies. Núcleo diferenciado, único o múltiple; otras partes estructurales como orgánulos. Locomoción por flagelos, pseudópodos, cilios o movimientos de la propia célula.

Algunas especies con cápsulas protectoras o testas; muchas especies forman quistes o esporas resistentes para sobrevivir a las condiciones adversas o para la dispersión. De vida libre, comensales, mutualísticos o parásitos.

Nutrición variada:

Holozoicos, que se alimentan de otros organismos (bacterias, levaduras, algas, otros protozoos).

Saprotitos, que se alimentan de sustancias disueltas en su medio. Saprozoicos, que se alimentan de restos de animales muertos.

Holofíticos, también conocidos como autótrofos, es decir, que produce alimento por fotosíntesis (como las plantas). Algunos combinan dos métodos. En la actualidad existen unas 50.000 variedades de protozoos. Muchas especies son de vida libre, mientras que otras parasitan al hombre y a los animales (domésticos y salvajes). Las infecciones pueden ser asintomáticas o bien llevar a la muerte, dependiendo de la especie y cepa del parásito, así como de la resistencia del huésped (Yaeger, 1989).

De la clasificación

El siguiente es un resumen de la clasificación sistemática de los Protozoos (Villée, 1999).

Protozoos flagelados

Filo Dinophyta.

Dinoflagelados: Fitoflagelados con un flagelo ecuatorial y otro longitudinal localizados en surcos.

Los protozoos parásitos se clasifican en tres Phylum, en base a su forma de moverse:

Phylum Sarcomastigophora o Subphylum Sarcodina

- amoebae (con movimiento mediante la emisión de pseudópodos).

Subphylum Mastigophora

- flagelados que se mueven mediante uno o más flagelos (similares a látigos).

Phylum Ciliophora

- ciliados que se mueven mediante cilios (filamentos parecidos a pelos).

Phylum Apicomplexa

- apicomplexos: se mueven mediante la flexión del cuerpo. Todos los integrantes de este phylum son parásitos. Usan el complejo apical para invadir el cuerpo del huésped. Tienen reproducción sexual y asexual (Yaeger, 1989).

3.7 Principales enfermedades provocadas por protozoarios.

Son organismos imposibles de detectar a simple vista. A diferencia de los metazoarios, los protozoarios se multiplican dentro de su hospedante. Se distingue, generalmente, una forma vegetativa o de multiplicación asexual, período durante el cual el parásito crece

originando millares de protozoarios capaces de invadir íntegramente las células del organismo, determinando su destrucción, y una forma enquistada, que se lleva a cabo fuera del organismo del hospedador y en la que el protozario se encierra dentro de una envoltura resistente a los elementos ambientales externos. En el perro se presentan enfermedades causadas por protozoarios que afectan los tejidos, la sangre y la región gastrointestinal.

LEISMANIOSIS

La transmisión de la enfermedad se produce a través de un agente conductor, el *Phlebotomus* sp. En el hombre, la leishmaniosis se diferencia según su aspecto clínico: la cutánea o Botón de Oriente, producida por la *Leishmania trópica*; la visceral, producida por la *L. infantum*, y la *L. donovani*. Algunos autores sostienen que la *L. donovani* es el agente responsable de la enfermedad del perro.

TRIPANOSOMIASIS

La tripanosomiasis es considerada una enfermedad rara en el perro. Se han encontrado perros infectados de *Trypanosoma cruzi*, *T. evansi* y *T. brucei*, los cuales, además de presentar un cuadro clínico grave, constituyen un punto de infección para el hombre y otros animales. El *Trypanosoma* sp, es transmitido por picadura de moscas, tábanos y otros insectos hematófagos que pueden actuar como transmisores.

PIROPLASMOSIS

La babesiosis es una enfermedad determinada por la presencia del parásito *Babesia canis* en los glóbulos rojos de la sangre. Ha sido descrita en perros de muchas regiones de la Tierra: América, Asia, Africa y Europa. El pasaje del animal infectado al sano se produce a través de las garrapatas, que cumplen la función de transmisoras de esta grave enfermedad.

GIARDIASIS

La *Giardia intestinalis* pertenece a la categoría de los protozoarios flagelados difundidos por todo el mundo. Esta se localiza no solamente en el intestino del perro, sino también en el del gato, el conejo, la vaca y el hombre. Está considerado como un parásito normalmente presente en la región intestinal, pero que por diversos factores como

errores alimenticios (exceso de carbohidratos), parasitosis, etc., se multiplica de manera repentina. Logra la fluidificación de las heces que se presentan ricas en mucosidades a causa de una enterocolitis, a menudo grave.

Síntomas. Diarrea con evacuaciones frecuentes, acompañada de cólicos.

AMEBIASIS

La Entamoeba histolytica, parásito unicelular, es uno de los más importantes que afecta al hombre. Está presente un poco por todo el mundo, pero tiene su máxima difusión en las zonas tropicales. Se han descrito casos de amebiasis incluso en el perro. La enfermedad tiene una incubación que puede variar de unos pocos días a muchos meses. Se distingue una forma vegetativa durante la cual se produce una multiplicación en las criptas del colon.

Como consecuencia de ello se tiene formaciones de úlceras que terminan en diarrea con presencia de mucosidad y sangre, y una forma enquistada que es el mecanismo a través del cual la Entamoeba histolytica resiste en ambiente externo.

BALANTIDIASIS

El Balantidium coli es un protozoo aliado que vive en la mucosa intestinal. Puede infectar no sólo al perro, sino también al hombre, al cerdo, al mono, etc. Causas desencadenantes pueden determinar la penetración de este parásito en la mucosa intestinal, causando colitis ulcerosas con presencia de sangre.

Síntomas. Diarrea sanguinolenta, deshidratación, anorexia.

TOXOPLASMOSIS

Esta enfermedad es causada por el protozoo Toxoplasma gondii. La evidencia sugiere fuertemente que las personas (y los gatos) pueden adquirir la enfermedad al comer carne de puerco, ternera, o res sin cocer o a medio cocer que contengan los organismos del toxoplasma. La toxoplasmosis por lo general es asintomática. Cuando es sintomática afecta el cerebro. El sistema linfático y los pulmones. Los signos incluyen fiebre, letargo,

pérdida de apetito, pérdida de peso, diarrea, tos y dificultad para respirar. Los nódulos linfáticos pueden agrandarse.

COCCIDIOSIS

En las heces del perro se han aislado, frecuentemente, parásitos unicelulares como *Eimeria canis*, *Isopora canis*, *Isopora bigemina*, *Isopora felis*, *Isopora rivolta* e *Isopora obioensis*, sin que por ello se pusieran en evidencia signos clínicos. Las manifestaciones patológicas son marcadas en los ejemplares jóvenes y en los adultos que no tienen condiciones ambientales y alimenticias adecuadas.

Síntomas. Con frecuencia, en los ejemplares adultos, la coccidiosis es asintomática. En cambio, en los cachorros, el síntoma principal es diarrea con presencia de sangre, mucosidad densa y gelatinosa, anorexia, deshidratación y complicaciones por parte de bacterias o virus que agravan el cuadro clínico.

UNIDAD IV

ESTERILIZACIÓN Y DESINFECCIÓN

4.1 Conceptos generales de desinfección, sanitización y esterilización

Históricamente la prevención y el control de las enfermedades transmisibles estaban íntimamente unidos a procedimientos como el salazón, el ahumado, la ebullición, etc., incluso sin comprender los mecanismos por los cuales estas actividades evitaban la transmisión de infecciones. Con el descubrimiento de los microbios se comprendieron la causa de las enfermedades infecciosas y sus mecanismos de transmisión, y de forma paulatina fueron surgiendo nuevos métodos para impedir dicha transferencia. El cirujano inglés Joseph Lister fue el primero en percatarse de la importancia de la asepsia en el ámbito quirúrgico, y desarrolló por primera vez la idea de prevenir las infecciones de herida quirúrgica con el uso de métodos antisépticos I.

El concepto de asepsia hace referencia a la utilización de procedimientos que impidan el acceso de microorganismos patógenos a un medio libre de ellos, por ejemplo mediante el lavado de manos, la instauración de técnicas de barrera o la limpieza habitual. Antisepsia es el conjunto de procedimientos o actividades destinados a inhibir o destruir los

microorganismos potencialmente patógenos. Para la implementación de la antisepsia se usan los biocidas, tanto en piel y tejido humanos (antisépticos) como en objetos, superficies o ambiente (desinfectantes). La revolución terapéutica que supuso el descubrimiento de los antibióticos hizo que los biocidas pasaran a un segundo plano. La emergencia del grave problema de la multirresistencia bacteriana, que nos sitúa en una «era preantibiótica», hizo que volvieran a adquirir importancia.

La esterilización, otra piedra angular de la antisepsia, tiene como objetivo la eliminación de cualquier microorganismo, nocivo o no.

Biocidas

Biocidas son aquellas sustancias que por medios bien químicos o bien biológicos pueden destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un efecto de control sobre cualquier organismo nocivo². Recientemente se ha propuesto una definición más simple y clara según la cual un biocida es una molécula química activa en un producto para inhibir o destruir bacterias. La actividad antimicrobiana es el efecto letal o inhibitorio, tanto de un producto biocida como de un antibiótico.

La evaluación de la actividad antimicrobiana ofrece dificultad por el amplio número de ensayos disponibles para evaluar la eficacia de los biocidas y por la ausencia de consenso para la estandarización de métodos para algunas fases de los estudios. En Europa, el European Committee for Standardization (CEN) creó el comité técnico 216 (TC216) para la estandarización de las pruebas de evaluación de eficacia de los antisépticos y desinfectantes⁴. Los países miembros deben adaptar sus estándares nacionales, las normas UNE-EN en el caso de España, a las normas europeas. A pesar de los intentos de armonización, existen lagunas; por ejemplo, actualmente no hay normas europeas para el ensayo de desinfectantes contra biofilms para aplicaciones de cuidado de la salud³.

Los biocidas de uso sanitario deben atenerse a la legislación aplicable en cada país. En España los desinfectantes que se utilizan específicamente con los dispositivos médicos se consideran productos sanitarios clase IIA y deben llevar el marcado CE⁵, precisando la intervención de un organismo notificado que inspeccione y verifique la calidad del producto antes de otorgarle la marca CE. Los desinfectantes de ambientes y superficies, así como los antisépticos para piel sana o intacta utilizados en los ámbitos clínicos o quirúrgicos, no se consideran producto sanitario, pero requieren autorización sanitaria

como desinfectantes otorgada por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) y deberán exhibir en su etiquetado el número de autorización «n. °-DES» que corresponda a dicha autorización. Los desinfectantes destinados a aplicarse sobre heridas, mucosas o piel dañada son considerados especialidades farmacéuticas y deben poseer la correspondiente autorización de comercialización como medicamento otorgada por la AEMPS.

Espectro y mecanismo de acción

Los mecanismos de acción de los biocidas se centran en alterar la estructura del microorganismo, bien sea impidiendo la entrada y salida de elementos vitales para el microorganismo o alterando estructuras. Las dianas se sitúan en la pared celular, en la membrana citoplasmática o en el citoplasma⁶.

Para la selección de un biocida hay que tener en consideración diversos factores del biocida, del germen y de la exposición, ya que de ellos dependerá su efectividad (tabla I). La concentración del biocida y el tiempo de contacto son cruciales, y su efecto combinado se determina con el parámetro CT (contact time), que se expresa como mg·min/l y determina cómo afecta un desinfectante a un tipo de microorganismo y bajo unas condiciones específicas. El CT se utiliza para comparar la efectividad de diferentes biocidas. Otros factores importantes son la estabilidad de los compuestos activos de los biocidas en el medio ambiente, la temperatura del medio ambiente (a temperaturas bajas la efectividad es menor) o la presencia de sustancias interferentes, como proteínas o materia orgánica, así como la presencia de biofilms^{3,7}.

Tabla I.

Características de los biocidas más frecuentemente utilizados

Resistencias

El interés por las resistencias bacterianas a los biocidas es proporcional al incremento de uso de estos productos ante la emergencia de las resistencias bacterianas a antimicrobianos. Los primeros estudios que hicieron referencia a esta problemática describían situaciones de emergencia de resistencias bacterianas a los biocidas como resultado de un mal uso o defectuoso almacenamiento (y posterior contaminación) de los mismos^{8,9}. Estudios más recientes han descrito la falta de efectividad de los biocidas utilizados en hospitales sobre aquellos microorganismos que crecen y se multiplican en

los biofilms de superficies y dispositivos médicos, lo que conlleva un fracaso en el control de estos reservorios para la prevención de infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria (IRAS)^{10,11}. De cualquier forma, la mayor parte de la evidencia sobre resistencia a los biocidas proviene de los ensayos de laboratorio.

La concentración de los biocidas es considerado el factor más relevante para la definición de resistencia bacteriana a los mismos. Muchos de los estudios sobre resistencia a biocidas basan sus hallazgos en la concentración mínima inhibitoria (CMI). El uso de este parámetro para dicho objetivo es discutible, ya que en la práctica se utilizan concentraciones mucho más elevadas y es improbable que no se logre una reducción del número de bacterias como resultado de una elevada CMI. Por ello actualmente se considera la concentración bactericida mínima (CBM) como el mejor parámetro de resultado de eficacia de un biocida, ya que permite comparar la letalidad entre una cepa estándar y la estudiada. Por otra parte, la determinación de la letalidad de un biocida con la concentración de uso indicará si la cepa bacteriana es o no susceptible (resistencia intrínseca o natural) o resistente al compararla con el estándar³.

El tándem resistencias bacterianas y biocidas tiene 2 vertientes definidas; por una parte, la resistencia bacteriana a las sustancias químicas biocidas, y por otra, el papel del biocida en la inducción de resistencia bacteriana a antibióticos.

La resistencia de un microorganismo a un determinado biocida puede ser una propiedad natural (intrínseca o innata), y entonces se habla de no susceptibilidad, o una resistencia adquirida. En términos globales, el mecanismo de resistencia innata más frecuentemente descrito reside en las características de la membrana celular; la naturaleza y la composición de la misma dependen del tipo de organismo y puede actuar como una barrera en la que puede haber una absorción reducida. Esta circunstancia puede tener relevancia práctica en esporas bacterianas, en concreto de algunas especies como el *Clostridium difficile*^{3, 6, 12,13}. En la figura 1 se muestran diferentes microorganismos ordenados en función de su nivel de resistencia natural a los desinfectantes.

Principales agentes causales de enfermedades infecciosas en orden decreciente de resistencia a los desinfectantes. Entre paréntesis figuran algunos ejemplos característicos.

ECJ: enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. VHB: virus de la hepatitis B. VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

Como en los antibióticos, la resistencia también puede ser adquirida, y los mecanismos en ambos casos son muy semejantes. Puede surgir por mutación o por la adquisición de material genético en forma de plásmidos o transposones. Aunque la adquisición de genes de resistencia ha sido documentada, la información disponible sobre el efecto de los biocidas en la transferencia de los determinantes genéticos es escasa y a veces con resultados opuestos según el biocida estudiado. Por ejemplo, al estudiar el efecto del uso de biocidas a concentraciones subinhibitorias el resultado en unos casos puede ser inhibitorio y en otros potenciador sobre la transferencia de resistencia^{3,14}. La tabla 3 resume los principales mecanismos bacterianos de resistencia a los biocidas.

Tabla 3.

Mecanismos bacterianos de resistencia a los biocidas

Mecanismo	Naturaleza	Susceptibilidad a otros biocidas	Resistencia cruzada
Permeabilidad	Intrínseca (adquirida)	No	Sí
Bomba expulsión (Efflux)	Intrínseca/adquirida	Reducida	Sí
Degradación	Adquirida/intrínseca	Reducida	No
Mutación (lugar diana)	Adquirida	Reducida	No
Cambio fenotípico	Tras exposición	Reducida	Sí
Inducción (respuesta de estrés)	Tras exposición	Variable	Sí

Fuente: SCENIHR Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides 2009.

No con otros biocidas pero sí con antibióticos específicos.

Otro punto de interés es la resistencia cruzada entre biocidas y antibióticos. El proyecto «Confronting the clinical relevance of biocide induced antibiotic resistance» (BIOHYPO), financiado con fondos europeos, investigó la asociación entre el

uso extendido de biocidas y la resistencia a antibióticos en patógenos humanos. Para ello, se analizaron 4 biocidas sobre patógenos humanos: cloruro de benzalconio, clorhexidina, triclosán e hipoclorito sódico. Estas pruebas han determinado los puntos de corte ecológico (ECOFF) de CMI y CBM de los biocidas 14-16. En líneas generales, y excepto en casos muy puntuales, no se ha observado una relación significativa entre la baja sensibilidad de los patógenos a los biocidas y la resistencia a antibióticos. No obstante, los investigadores prevén cambios en un futuro y será imprescindible estar alerta al progreso de la evidencia disponible 15,16.

Desde un punto de vista práctico, aunque la resistencia bacteriana se ha descrito en casi todos los biocidas, la repercusión clínica se considera irrelevante, apoyados en el hecho de que las concentraciones usadas en la práctica son sustancialmente superiores a las CMI de las cepas con susceptibilidad reducida 3,16-18.

4.2 Diferenciación entre asepsia y antisepsia.

Los antisépticos son una de las armas más poderosas en el control de la infección. La disponibilidad de los mismos está limitada por la toxicidad de algunos o por la fácil contaminación de otros. Los antisépticos más frecuentes en cuidados sanitarios son la clorhexidina, el alcohol y la povidona iodada. La selección de uno u otro, así como la concentración y solución, dependerán del objetivo de aplicación.

Piel intacta

La povidona iodada como tal carece de actividad hasta que se va liberando el yodo, verdadero agente de la actividad antiséptica. Se utiliza a concentraciones del 1, 7,5 y 10%, puede causar hipersensibilidad en algunas personas con alergia al yodo y no debe usarse en embarazadas, neonatos o personas con bocio. La clorhexidina actúa rápidamente y posee gran actividad bactericida. Se aplica a una concentración de 0,5%. El alcohol al 70% es un bactericida de acción rápida, llegando a eliminar el 90% de las bacterias de la piel en 2min si se permite secar al aire; el frotado con algodón destruye un máximo del 75% 19.

En los últimos años ha surgido una amplia producción científica, en general con resultados favorables a la clorhexidina, aunque muchos de ellos esconden una sobrevaloración del alcohol incorporado a la solución 20,21. En general, cuando se requiere un efecto prolongado se prefiere la clorhexidina, y cuando se busca un efecto inmediato, mejor

povidona iodada²². El paquete de medidas (bundle) descrito por el Institute for Healthcare Improvement (IHI) para la prevención de las infecciones relacionadas con catéter establece la recomendación de antisepsia del sitio de inserción con clorhexidina al 2% en solución alcohólica. Otras guías son menos restrictivas en la recomendación, considerando que cuando el catéter es venoso periférico puede usarse con la misma eficacia cualquiera de los 3 antisépticos, y en los catéteres venosos centrales o arteriales periféricos hay que usar clorhexidina alcohólica en concentración superior al 0,5%^{23,24}. De los estudios sobre preparación de piel para la incisión quirúrgica no parece desprenderse ningún resultado concluyente sobre la superioridad de un antiséptico sobre otro, aunque sí parece apreciarse una ventaja en la utilización de antisépticos en solución alcohólica, incluso a concentraciones elevadas^{21,25,26}. El uso de estas soluciones debe recibir una correcta aplicación, ya que son inflamables y pueden dar lugar a eventos adversos con dispositivos eléctricos. Respecto a la ducha o baño previo a la intervención, como prevención de infecciones del sitio quirúrgico, los resultados no encuentran diferencias entre antisépticos, e incluso entre estos y el empleo de agua y jabón neutro²⁷. Entre las medidas para el control de epidemias por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y de *Enterococcus* sp. resistente a vancomicina (ERV) en instituciones sanitarias, se describió la utilidad del uso de descolonización con higiene corporal con solución jabonosa de clorhexidina al 2%²⁸, y la recomendación se ha extendido a otros gérmenes multirresistentes (GMR)²⁹.

Piel no intacta

En general, sobre las heridas no se aconseja el uso de antisépticos por ser citotóxicos, retrasar la curación y ser más perjudiciales que beneficiosos cuando no se usan en las concentraciones apropiadas. Sin embargo, el uso de antisépticos a concentraciones adecuadas es efectivo y bien tolerado, recomendando su cese de uso cuando los primeros signos clínicos de mejoría comienzan a detectarse. Como recomendación general, las soluciones empleadas son las acuosas. La povidona iodada es a concentraciones del 2,5%, o del 10% si es en apósitos impregnados. En la clorhexidina para descontaminación, la concentración es del 0,5%. En un reciente estudio sobre úlceras venosas crónicas la única evidencia disponible propone el uso de cadexómero yodado al 0,9%, que es un producto consistente en la unión de un dextranómero, agente potenciador del desbridamiento químico, e iodo³⁰. Algunos gérmenes que actualmente invaden nuestras instituciones, como *Pseudomonas* sp., con perfiles de resistencia cada vez más amplios y que por otra

parte son causa frecuente de colonización e infección de heridas, pueden verse beneficiados de alternativas antisépticas no muy comunes, como el ácido acético en concentraciones iguales o superiores al 0,5% en solución salina para irrigación o sobre compresa empapada³¹.

Mucosas

Sobre mucosas, 2 indicaciones básicas. La higiene oral con clorhexidina al 0,12% o al 0,2% disminuye la incidencia de neumonía asociada a ventilador³², por lo que ha entrado a formar parte básica de los bundles de prevención con diana en este tipo de infección. Otra aplicación es la preparación vaginal antes de una cesárea con soluciones de povidona yodada que reduce el riesgo de endometritis posterior³³.

4.3 Agentes químicos desinfectantes y esterilizantes

La limpieza, como paso previo cronológicamente a la desinfección, constituye un factor de importancia prioritaria. Una limpieza incorrecta o defectuosa repercutirá de forma negativa en las sucesivas etapas del proceso de antisepsia/desinfección o esterilización. El proceso de desinfección, a diferencia de la esterilización, solo es capaz de eliminar la mayor parte de los gérmenes patógenos (pero no todos). Además, por las características del procedimiento, el material desinfectado pierde rápidamente esta propiedad por carecer del factor de empaquetado que lo proteja de contaminaciones. El espectro de gérmenes sobre los que es efectivo un desinfectante varía de uno a otro, o en un mismo desinfectante en dependencia de sus concentraciones y su tiempo de exposición. Según el nivel de cobertura alcanzado por un desinfectante, se puede clasificar como de nivel alto cuando incluye esporas bacterianas, de nivel intermedio cuando incluye micobacterias pero no esporas, o de nivel bajo cuando no incluye ni micobacterias ni esporas⁷.

Los criterios de elección de procesado del material de uso sanitario con desinfección, en sus diferentes niveles, o con esterilización, lo esquematizó Spaulding en 1968, y permanece en vigor la clasificación que realizó de dispositivos, según el nivel de riesgo que dichos materiales tuviesen de desarrollar infección^{7,34}. Las 3 categorías que describió son:

-

Crítico: todo material contaminado por cualquier germen que tenga un alto riesgo de desarrollar infección. Incluye todo material que entra en contacto con cavidades estériles o sistema vascular.

-

Semicrítico: material que entra en contacto con mucosas o piel no intacta. Estos dispositivos deberían estar libres de microorganismos, aunque pueden estar permitido un pequeño número de esporas bacterianas, ya que las membranas mucosas (pulmonar, gastrointestinal, etc.) tienen generalmente resistencia a la infección por esporas bacterianas comunes.

No crítico: material que se utiliza sobre piel intacta.

El material crítico debe ser sometido a esterilización antes de su uso.

El material semicrítico debe ser sometido a desinfección de alto nivel antes de su uso. Es en la práctica el de mayor riesgo, ya que con ellos se han detectado más infecciones asociadas a cuidados sanitarios que con los críticos o no críticos. Los primeros porque se les somete a esterilización, y los segundos por su escaso riesgo intrínseco. El glutaraldehído, el peróxido de hidrógeno, el ortofenilaldehído (OPA), el ácido peracético, el peróxido de hidrógeno y el cloro son considerados desinfectantes de alto nivel. El reprocesado de material sanitario semicrítico para su desinfección tiene lugar a través de contacto con líquido desinfectante y puede ser manual o automático. El tiempo de contacto oscila entre 8 y 45min a temperaturas entre 20 y 25°C. El reprocesado automático mediante máquinas desinfectadoras minimiza los errores humanos, evita contacto de los profesionales con sustancias tóxicas y no requiere de sistemas de ventilación especiales^{35,36}.

Dentro de la categoría de material semicrítico, mención especial merece el procesado del material endoscópico. Los endoscopios flexibles, por el tipo de cavidad en la que penetran, adquieren alta carga microbiana, y aunque se han publicado numerosas guías y recomendaciones para el reprocesado de endoscopios, la adherencia a las mismas tiene importantes áreas de mejora. En este contexto ha adquirido mucha relevancia la introducción de nueva tecnología, tanto en los desinfectantes como en las mejoras de los procesadores automáticos. Sobre estos últimos, todos los modelos tienen ciclos de desinfección y aclarado, y algunos también limpieza con detergente, vaporización de

alcohol y/o ciclos de secado forzado con aire; no obstante, no todos son compatibles con todos los desinfectantes de alto nivel o con todos los fabricantes de endoscopios del mercado, por lo que en la selección habrá que tenerlo en cuenta. Por la repercusión que los procedimientos con este tipo de material endoscópico tienen en la seguridad del paciente, está muy debatida actualmente la necesidad de controles microbiológicos en la monitorización de este material. Un método de control nuevo es el basado en la bioluminiscencia de adenosín-trifosfato (ATP) para la monitorización de la limpieza, principal causa de fallo del proceso efectivo de desinfección^{36–38}.

El material no crítico, a diferencia del material crítico y semicrítico, requiere desinfección de nivel medio o bajo. Aunque en sí mismo no supone un riesgo, pueden actuar como fómite en la transmisión, por contaminación a través de manos o piel colonizada. Los productos más frecuentemente usados como desinfectantes de nivel medio son los fenoles y los compuestos de cloro con un tiempo de contacto de al menos un minuto. Entre los de nivel bajo, encontramos añadidos a los anteriores los compuestos de amonio cuaternarios, con el mismo tiempo de contacto recomendado^{35,36}.

Superficies

El papel de las superficies contaminadas está teniendo un creciente protagonismo con la emergencia de los GMR. La persistencia de estos organismos en objetos y materiales del entorno del paciente ha conllevado el rescate de la limpieza y desinfección de las mismas como uno de los mecanismos de control y prevención básicos en la transmisión de infecciones por GMR. En la mayoría de los casos el biocida más eficaz es el hipoclorito sódico a concentraciones de 1.000pp,

Ambiente

Al igual que en las superficies, la emergencia de GMR y su demostrada persistencia en el medio ambiente han supuesto una actualización de métodos desechados hace tiempo, como por ejemplo la fumigación de habitaciones. La tecnología ha modernizado la vaporización ambiental de un desinfectante, en este caso el peróxido de hidrógeno, más inocuo que el usado tiempo atrás. Se ha demostrado efectivo para *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Clostridium*.

Esterilización

La esterilización se define como el proceso mediante el cual se destruyen todos los microorganismos viables presentes en un objeto o superficie, incluidas las esporas bacterianas. El concepto de esterilidad expresa una condición absoluta: un determinado objeto o superficie está estéril o no está estéril. Puesto que la esterilidad no puede demostrarse de manera absoluta sin causar la destrucción completa de todas las unidades esterilizadas, se define la esterilidad en términos probabilísticas y se considera que un producto crítico es estéril cuando la probabilidad de que una unidad estéril contenga algún microorganismo en forma activa o latente es igual o menor de 1 entre un millón (SAL [sterility assurance level] o coeficiente de seguridad de esterilidad de 10^{-6})⁴².

El paso previo e imprescindible para una correcta esterilización es la limpieza exhaustiva del material a esterilizar. A través de un proceso mecánico se elimina, por arrastre, la suciedad visible y la materia orgánica de una superficie u objeto, reduciendo el número de microorganismos y protegiendo los instrumentos contra la corrosión y el desgaste.

El empaquetado tiene como objetivo mantener el instrumental aislado de toda fuente de contaminación, conservando la esterilidad conseguida en el proceso de esterilización. El embalaje debe ser adecuado para permitir la penetración del agente esterilizante según el método de esterilización escogido, en función de las características y el uso que se vaya a dar a los materiales a esterilizar y del tiempo de esterilidad requerido⁴³.

Esterilización de dispositivos médicos y quirúrgicos

Aunque una gran mayoría de los dispositivos médicos y quirúrgicos utilizados en el ámbito sanitario son resistentes al calor, desde los años cincuenta ha habido una tendencia creciente a utilizar dispositivos médicos e instrumental quirúrgico fabricados con materiales sensibles al calor, lo que ha hecho necesario desarrollar tecnologías de esterilización a baja temperatura como son el óxido de etileno, el plasma o el vapor de peróxido de hidrógeno, el ozono, etc.⁷.

La elección de un método u otro de esterilización no son arbitrarios, sino que según el RD 1591/2009 el fabricante debe especificar en ficha técnica si un determinado material es o no reprocesable, así como el método y las condiciones para el correcto reprocesamiento del mismo.

En la tabla 4 se refieren los distintos métodos de esterilización más ampliamente utilizados en el ámbito hospitalario, con sus ventajas e inconvenientes⁴⁴.

Tabla 4.

Ventajas e inconvenientes de los diferentes métodos de esterilización

Método esterilización	Ventajas	Inconvenientes
Vapor	No tóxico para paciente, personal o medio ambiente	
	Ciclo fácilmente monitorizable	
	Rápido efecto microbiocida	
	Sistema menos afectado por los restos orgánicos o inorgánicos	No apto para material termosensible
	Rapidez del ciclo Muy buena penetración en empaquetados médicos y en dispositivos con lúmenes	Por la exposición repetida puede dañar el material (p.ej., algún instrumentos de microcirugía) Puede dejar instrumental húmedo, con el riesgo de oxidación del mismo
	Seguro para el medio ambiente, no deja residuos tóxicos y no precisa aireación	Posibilidad de quemaduras
	Permite esterilizar material sensible a temperatura (<50°C) y humedad, tanto metálicos como no metálicos	
Peróxido de hidrógeno gas plasma	Duración del ciclo estándar 47minFacilidad de manejar y monitorizar los ciclos	No permite procesar celulosa, tela o líquidos Limitaciones para procesar dispositivos en función del diámetro de la luz y la longitud
	Instalación simple, solo precisa toma eléctrica	Muy sensible a la presencia de humedad en la cámara
	Compatible con gran cantidad de instrumental y dispositivos médicos	Requiere envolturas Tyvek y contenedores especialesEl peróxido de hidrógeno puede ser tóxico a niveles mayores de 1ppm TWA

Método esterilización	Ventajas	Inconvenientes
Peróxido de hidrógeno vapor	<p>Seguro para trabajadores y el medio ambiente No deja residuos tóxicos y no precisa aireación Duración del ciclo 28min (ciclo sin lúmenes), 55min (ciclo con lúmenes)Permite esterilizar material sensible a temperatura (<50°C) y humedadFacilidad de manejar y monitorizar los ciclosFácil instalación</p>	<p>No permite procesar celulosa, tela o líquidos</p> <p>Limitaciones para procesar dispositivos en función del diámetro de la luz y la longitud (p.ej., lúmenes de acero inoxidable de <de 1mm de diámetro o más de 125mm de longitud).Precisa catalizador</p> <p>Requiere envolturas Tyvek y contenedores especialesEl peróxido de hidrógeno puede ser tóxico a niveles mayores de 1ppm TWA</p>
Óxido de etileno	<p>Alta eficacia microbicidaBuena difusión y penetrabilidad en embalajes y lúmenes</p> <p>El uso de cartuchos individuales y cámaras de presión negativa minimiza la posibilidad de fuga y exposición a OEFacilidad de manejar y monitorizar los ciclosCompatible con gran cantidad de instrumental y dispositivos médicos</p>	<p>El envasado puede realizarse en bolsa de papel mixto y en bolsa de papel Tyvek y contenedores especialesEs absorbido por muchos materiales y requiere un tiempo de aireación para eliminar los residuos del O</p> <p>Limitaciones dependiendo de la longitud y del diámetro de la luz, presencia de sales inorgánicas o materia orgánico es tóxico, carcinogénico, inflamable Precisa usar catalizadores para transformar el residuo en CO2 y H2O Los cartuchos deben guardarse en armarios para líquidos inflamables Duración del cicloIncompatibilidad con algunos metales (p.ej., Al, Sn, Mg, Zn), puede fijarse a algunos materialesIncapacidad para inactivar priones</p>
Ozono	<p>Permite esterilizar material sensible a temperatura (<50°C) y humedadNo tóxico (se genera a partir de oxígeno y agua), no precisa aireación Aprobado por la FDA para los instrumentos de metal y de plástico, incluso algunos instrumentos con lúmenesDuración ciclo ≥46min</p>	<p>Uso limitado clínica (no hay datos publicados sobre la compatibilidad/penetrabilidad/resistencia de la materia orgánica de materiales) y los datos de eficacia microbicida sin limitados</p>

Adaptado de Rutala y Weber.

La esterilización por vapor es el método que presenta el mayor margen de seguridad por su fiabilidad, consistencia y letalidad. El vapor destruye los microorganismos por coagulación irreversible y desnaturalización de las enzimas y proteínas estructurales. El principio básico de la esterilización en autoclaves de vapor es la exposición del material a la temperatura requerida a una presión determinada durante un tiempo especificado. Para lograr la penetración y la difusión del vapor dentro de la cámara es necesario eliminar previamente el aire de la cámara. Esto se puede conseguir de forma pasiva, por gravedad (autoclaves gravitatorias), o de forma activa, mediante pulsos de vapor y extracción por una bomba de vacío, que es la que utilizan de forma habitual las autoclaves en el ámbito hospitalario. Para detectar fugas de aire o extracción insuficiente del aire de la cámara que originarían ciclos de esterilización no efectivos se utiliza la prueba de Bowie&Dick. Las temperaturas más comúnmente utilizadas para la esterilización por vapor son 121 y 132-134°C. La presión debe ser mayor para alcanzar temperaturas más altas (por ejemplo, 1,05bar para 121°C y 2bar para 134°C). Desde el punto de vista de la duración de los ciclos para alcanzar la esterilización, a mayor temperatura es necesario menor tiempo de exposición (a 121°C el tiempo de exposición necesario es de 20min y a 134°C, de 3,5min), y a temperaturas constantes, los tiempos de exposición van a variar dependiendo del tipo de material, de si el material está envuelto o no y del tipo de esterilizador. Con objeto de minimizar la duración de los ciclos y poder utilizar el material en el menor tiempo posible, se definieron los ciclos «Flash». Este tipo de esterilización es una modificación de la esterilización a vapor convencional en el que el material a esterilizar se coloca sin envolver en una bandeja abierta o en un recipiente o envoltura especialmente diseñados para permitir una rápida penetración del vapor de agua.

Para reprocesar material crítico sensible al calor o a la humedad deben usarse métodos de esterilización a baja temperatura. Estos métodos provocan la muerte de los microorganismos por la acción de agentes químicos, bien por oxidación química (mecanismo utilizado por los peróxidos, el ácido peracético o el gas plasma de peróxido de hidrógeno), bien por alquilación (mecanismo utilizado por el óxido de etileno o el formaldehído).

El óxido de etileno se utiliza desde los años cincuenta como agente esterilizante a baja temperatura. Tiene una excelente actividad microbiocida, gran poder de difusión y penetrabilidad, y es relativamente económico.

Los rangos operativos son concentración de gas (450-1.200mg/l), temperatura entre 37-63°C, humedad relativa 40-80% y tiempo de exposición de 1-6h. Dentro de ciertas limitaciones, el aumento de la temperatura y de la concentración del gas puede reducir el tiempo de exposición necesario para lograr la esterilización⁷.

El peróxido hidrógeno gas plasma es una tecnología que se empezó a comercializar en 1993. Su mecanismo de acción se basa en una primera fase de difusión de gas de peróxido de hidrógeno y la posterior generación en una cámara de vacío, mediante radiofrecuencia o energía de microondas, de radicales libres que son capaces de interactuar con los componentes esenciales de las células (enzimas, ácidos nucleicos) inactivando los microorganismo.

El mecanismo de acción del peróxido hidrógeno vaporizado se basa en la difusión del peróxido de hidrógeno en fase vapor seco. No precisa necesariamente de cámara de vacío.

Control del proceso de esterilización

Para garantizar el proceso de esterilización es necesario comprobar los parámetros físicos del ciclo (controles físicos), verificar los parámetros críticos en el interior de los envases (controles químicos) y certificar la capacidad letal del ciclo de esterilización (controles biológicos). En la tabla 5 se especifican los controles indicados para cada tipo de esterilización⁴⁶.

Controles de calidad del proceso de esterilización

Físicos	Químicos	Biológicos
Esterilización por vapor		
Tiempo Temperatura Presión	Test de Bowie-Dick: penetración del vapor Control externo paquete/bolsa Indicador químico interno	Un control biológico semanal (la norma europea no menciona periodicidad) Tras la reparación de cualquier equipo, en caso de avería Cuando en la carga se incorpore algún paquete, bolsa o contenedor con material de prótesis o material para su implante

Físicos	Químicos	Biológicos
Esterilización por óxido de etileno		
Físicos	Químicos	Biológicos
	Control externo paquete	Un control biológico en cada ciclo o programa Tras la reparación de cualquier equipo, en caso de avería
TiempoPresiónTemperaturaHumedad	Indicador químico interno	
Esterilización por peróxido hidrógeno (gas-plasma/vaporizado)		
Físicos	Químicos	Biológicos
	Control externo paqueteIndicador químico interno	Un control biológico en cada ciclo o programaTras la reparación de cualquier equipo, en caso de avería
TiempoPresión		

Esterilización de material contaminado por priones

La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) es una enfermedad neurodegenerativa que se puede propagar a través de los instrumentos contaminados utilizados previamente en un paciente infectado. Solo se han registrado 4 casos en todo el mundo que implican instrumentos neuroquirúrgicos, pero la detección de proteína priónica anormal en otros tejidos orgánicos ha extendido el riesgo de contaminación a una amplia variedad de procedimientos médicos y quirúrgicos. Los métodos convencionales de esterilización y desinfección son insuficientes en la reducción de la infectividad de priones, y las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud son a menudo poco prácticas. A través de modelos matemáticos se ha establecido que después de 6 ciclos de limpieza y desinfección convencional la transmisión es improbable. Las estrategias de prevención básicas incluyen la utilización de instrumentos desechables cuando sea posible y poner en cuarentena a los instrumentos no desechables hasta que se compruebe el diagnóstico, y el uso de métodos especiales para reprocesar instrumentos ante sospecha de ECJ.

La elección de un procesado de material por desinfección o esterilización dependerá de 3 factores: riesgo del paciente de padecer la enfermedad (pacientes con diagnóstico confirmado o de sospecha elevada), la infectividad del tejido implicado en la instrumentación (cerebro, médula espinal, ojo y pituitaria) y el uso previsto del material.

Los instrumentos deben mantenerse húmedos después de su uso y hasta que se inicie la descontaminación, que será tan pronto como sea posible después de su uso. La alta

resistencia de los priones a los métodos estándar obliga a procedimientos especiales (tabla 6) tanto en esterilización para dispositivos críticos o desinfección para los semicríticos que han tenido contacto con tejidos de alto riesgo de los pacientes de alto riesgo

Adaptado de Rutala y Weber

4.4 Métodos y herramientas utilizados para éste fin.

4.5 Efectos de la esterilización y desinfección.

Los procedimientos de desinfección y esterilización adecuados, son cruciales para mantener el nivel de bioseguridad requerido en el laboratorio. A continuación se describen los principios generales de limpieza que son aplicables a todos los patógenos a excepción de los priones; para éstos, se señala en la Hoja de Seguridad de la Encefalopatía Espongiforme el procedimiento a seguir para la desinfección.

Los requerimientos específicos para descontaminación dependen del tipo de trabajo experimental que se realice en cada caso así como de la naturaleza del agente infeccioso. Por consiguiente, es necesario desarrollar procedimientos más específicos y estandarizados los cuales, a partir de la información general que aquí se da, llenen los requerimientos de los diferentes niveles de riesgo que pueden darse en cada laboratorio.

Prelimpieza y limpieza de material del laboratorio

En términos prácticos, limpieza es el acto de remover suciedad visible de un material. Lo anterior generalmente se logra por a) cepillar, aspirar o sacudir o b) lavar o limpiar con un trapo o esponja empapado en una solución de jabón o detergente. El prelavado debe hacerse rutinariamente cuando haya riesgo de contacto de humanos o animales con material infeccioso; el prelavado es necesario porque dichos residuos visibles que ensucian el material pueden abrigar microorganismos y también pueden interferir con la acción germicida de los desinfectantes químicos, de este modo, la desinfección y esterilización posteriores serán efectivas. Por otra parte, muchos desinfectantes actúan solamente si el material se ha limpiado previamente.

El prelavado debe hacerse cuidadosamente para evitar exponerse a los agentes infecciosos. El desinfectante químico que se utilice debe ser químicamente compatible con el material. Se recomienda utilizar desinfectantes distintos en el prelavado y en la desinfección.

Desinfectantes químicos

La selección del desinfectante debe tomar en cuenta las necesidades específicas de aplicación y uso. Deben seguirse las instrucciones del fabricante en cuanto a uso, almacenamiento y disposición. Muchos desinfectantes pueden causar daño a quienes los manejan y también al ambiente. Por seguridad personal es conveniente usar bata, guantes y protectores de ojos durante la preparación de las diluciones del desinfectante. A continuación se describen las principales clases de los desinfectantes más usuales, se da información genérica sobre su aplicación y perfil de seguridad. A menos que se indique lo contrario, las concentraciones de los desinfectante se dan en peso/volumen (p/v).

Cloro (hipoclorito de sodio)

El cloro es un desinfectante de fuerte acción oxidante, se encuentra como blanqueador en el mercado, en forma de solución de hipoclorito de sodio (NaOCl). En esta forma es muy alcalino y puede ser corrosivo para metales. Su actividad se reduce considerablemente frente a exceso de materia orgánica. Se recomienda tapar perfectamente los recipientes que contienen el hipoclorito para evitar la liberación de cloro gas y debilitar el poder germicida de la solución. Se recomienda la solución que contiene 5 g/l de cloro disponible como desinfectante de elección en situaciones de emergencia (derrames, etc.), en las que se encuentren virus como Hantavirus, Lassa y el Ebola.

Las soluciones de hipoclorito de sodio que se venden en el mercado como blanqueadores contienen una concentración de cloro disponible del 50% y deberán diluirse 1:50 o 1:100 para obtener las concentraciones finales de 1 g/l y 5 g/l respectivamente. Las soluciones industriales de blanqueador tienen una concentración de cerca de 120 g/l.

Dicloroisocianurato de sodio

El dicloroisocianurato de sodio (NaDCC) en polvo o en tabletas tiene la ventaja de que es fácil y seguro de almacenar. El NaDCC sólido puede aplicarse sobre derrames, sangre u otros RPBI líquidos y dejarse actuar por lo menos 10 min. Antes de retirarlo y lavar el área afectada.

La siguiente tabla resume las diluciones recomendadas de compuestos que liberan cloro.

DILUCIONES RECOMENDADAS PARA COMPUESTOS QUE LIBERAN CLORO

	Para uso sobre material “limpio” se requiere una concentración de cloro libre de 0.1% (1 g/l) ^a	Para uso sobre material “sucio” se requiere una concentración de cloro libre de 0.5% (5 g/l) ^b
Solución de hipoclorito de sodio (5% de cloro disponible)	20 ml/l	100 ml/l
Hipoclorito de calcio (70% de cloro disponible)	1.4 g/l	7.0 g/l
Dicloroisocianurato de sodio en polvo (60% de cloro disponible)	1.7 g/l	8.5 g/l
Dicloroisocianurato de sodio en tabletas (1.5 g de cloro disponible por tableta)	1 tableta por litro	4 tabletas por litro
Cloramina (25% de cloro disponible) ^c	20 g/l	20 g/l

A: Después de remover los residuos.

B: Parra vaciar sobre residuos (p.ej. sobre sangre o antes de remover los residuos).

C: Ver texto.

Cloraminas

Las cloraminas liberan el cloro más lentamente que los hipocloritos; además las soluciones de cloraminas no se inactivan tanto con la materia orgánica como lo hacen las soluciones de hipoclorito, por lo que puede emplearse la misma concentración para material “limpio” o “sucio”. Las soluciones de cloramina son prácticamente inodoras; sin embargo, el material que se ha sumergido en ellas debe enjuagarse perfectamente para eliminar cualquier residuo de excipientes adicionados a la cloramina-T (tosilcloramida de sodio) en polvo. Las cloraminas también pueden ser empleadas para desinfectar agua para consumo si son usadas a una concentración final de 1-2 mg/l de cloro disponible.

Dióxido de cloro

El dióxido de cloro es un desinfectante fuerte y de rápida acción, parece ser activo a niveles de cloro más bajos que los necesarios cuando se usa cloro como blanqueador. Una solución activa para usarse en el laboratorio, puede obtenerse a partir de ácido clorhídrico y clorito de sodio (NaClO_2). La estabilidad puede ser un factor a tener en cuenta para utilizar este desinfectante, así como su poder de corrosión y compatibilidad con los materiales.

Formaldehído

El formaldehído es un gas que mata todos los microorganismos y sus esporas a temperaturas de por lo menos 20°C ; no tiene actividad contra priones. Su acción es lenta y necesita una humedad relativa de cerca del 70%. Se comercializa como el polímero sólido, paraformaldehído en escamas o tabletas o como formalina, solución del gas en agua de alrededor de 370 g/l (37%), que contiene metanol (100 ml/l) como estabilizante. El gas se libera de ambas formulaciones al ser calentadas, éstas pueden usarse para descontaminación y desinfección de espacios encerrados tales como gabinetes de bioseguridad y habitaciones (ver más abajo la sección de descontaminación ambiental). El formaldehído (formalina al 5% en agua) puede utilizarse como desinfectante líquido.

Nota: Existe la sospecha de que el formaldehído puede ser carcinogénico. Tiene un olor muy penetrante y sus vapores pueden irritar los ojos y las membranas mucosas. Debe almacenarse en una campana de absorción de gases o en un área bien ventilada. Antes de utilizar el formaldehído debe consultarse un manual de seguridad química.

Glutaraldehído

El glutaraldehído ($\text{OHC}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$), como el formaldehído, también es un desinfectante activo contra formas vegetativas y esporas de bacterias y hongos y también actúa contra virus que contengan lípidos o sin ellos. El glutaraldehído no es corrosivo y su acción es más rápida que el formaldehído. Sin embargo, es necesario dejarlo actuar varias horas para matar esporas bacterianas. Se encuentra generalmente como solución en el mercado, a una concentración de cerca de 20 g/l (2%) y la mayor parte de los productos necesitan ser “activados” (alcalinizados) antes de usarse, mediante la adición de una sal de bicarbonato que se proporciona junto con el producto. La solución activada puede utilizarse por 1 a 4 semanas dependiendo de la formulación y el tipo y frecuencia de uso que se le dé. Si se enturbia la solución de glutaraldehído, debe descartarse.

Nota: El glutaraldehído es tóxico e irritante para la piel y las membranas mucosas, por lo que debe evitarse el contacto con este desinfectante. Debe usarse dentro de una campana de absorción o en áreas bien ventiladas. No es recomendable utilizarlo en forma de aerosol o en solución para descontaminar superficies en el medio ambiente. Antes de utilizar el glutaraldehído debe consultarse un manual de seguridad química.

Compuestos fenólicos

A pesar de que son compuestos que se utilizan desde hace tiempo, actualmente, a partir de los resultados que se han obtenido, su uso está restringido por seguridad. Son compuestos activos contra bacterias vegetativas y virus que contienen lípidos y cuando se usan adecuadamente, también tienen actividad contra micobacterias. No son activos frente a esporas y su actividad contra virus sin lípidos es variable. Muchos compuestos fenólicos se utilizan para la descontaminación de superficies en el medio ambiente y algunos de ellos se emplean también como antisépticos (p.ej. triclosán y clorhexinol). El triclosán es común en productos para el aseo de las manos. Es activo frente a

bacterias vegetativas e inoñas para la piel y las membranas mucosas. Sin embargo, se han hecho estudios de laboratorio donde se muestra que las bacterias que adquieren resistencia contra el triclosán, también son resistentes a ciertos tipos de antibióticos. Nota: No es recomendable emplear compuestos fenólicos en superficies que tengan contacto con alimentos ni en áreas donde se encuentren niños pequeños. Pueden ser absorbidos por el hule y también pueden penetrar la piel.

Compuestos de amonio cuaternario

Muchos compuestos de amonio cuaternario se usan en forma de mezclas y a veces, en combinación con otros desinfectantes tales como alcoholes. Tienen buena actividad frente a bacterias vegetativas y virus con lípidos. Algunos compuestos (p.ej. cloruro de benzalconio), se usan como antisépticos.

Nota: La actividad germicida de ciertos tipos de compuestos de amonio cuaternario, se ve reducida considerablemente por la materia orgánica, la dureza del agua y los detergentes aniónicos; por lo anterior, es necesario tener cuidado en seleccionar los agentes que se utilicen en el prelavado si se van a emplear compuestos de amonio cuaternario para la desinfección. Algunas bacterias potencialmente dañinas pueden crecer en soluciones de amonio cuaternario. Desde el punto de vista de protección ecológica, es necesario señalar que estos compuestos se acumulan en el ambiente.

Alcoholes

El etanol y el isopropanol tienen propiedades desinfectantes similares. Son activos contra formas vegetativas de bacterias y hongos y de virus que contienen lípidos; no tienen actividad contra esporas. Su acción frente a virus que no contienen lípidos es variable. Los alcoholes muestran mayor efectividad cuando se usan a concentraciones de alrededor del 70% (v/v) en agua: a concentraciones mayores o menores pueden no ser tan buenas germicidas. La ventaja de utilizar soluciones acuosas de alcoholes es que no dejan residuo en los objetos donde se aplican. Las mezclas con otros agentes son más efectivas que el alcohol solo, p.ej. alcohol etílico al 70% con formaldehído (100 g/l) y alcohol conteniendo 2 g/l de cloro disponible. La solución acuosa de alcohol al 70% (v/v), puede aplicarse sobre la piel, las superficies de

trabajo en los laboratorios y gabinetes de bioseguridad y también para sumergir instrumentos quirúrgicos pequeños. El tiempo de contacto con la piel no debe ser menos de 10 seg; pero sobre las superficies inertes, el tiempo no debe ser menos de 3 min. Debido a que el etanol puede reseca la piel, se suele mezclar con algún emoliente. En situaciones en las que no sea posible o conveniente, lavarse adecuadamente las manos, se recomienda frotarlas con productos a base de alcohol para descontaminarlas, si es que no están muy sucias. Sin embargo hay que recordar que el etanol no es efectivo contra las esporas y puede no ser efectivo contra todos los tipos de virus sin lípidos.

Nota: Los alcoholes deben almacenarse en recipientes que eviten su evaporación. Los alcoholes pueden endurecer el hule y disolver ciertos tipos de pegamento. Los frascos que contengan soluciones alcohólicas deben etiquetarse adecuadamente para evitar que se lleven equivocadamente a esterilizar a la autoclave.

Yodo y yodóforos

La acción de estos desinfectantes es semejante a la del cloro, aunque se ve menos inhibida por la materia orgánica. El yodo puede manchar las telas y las cubiertas de los muebles por lo que generalmente lo hace inadecuado para emplearlo como desinfectante. Sin embargo, los yodóforos y la tintura de yodo son buenos antisépticos. Los antisépticos a base de yodo generalmente no son adecuados para usarse en instrumentos médicos y dentales. El yodo no debe usarse sobre objetos de aluminio o cobre. Nota: el yodo puede ser tóxico. Los productos a base de compuestos orgánicos yodados deben almacenarse a 4-10° C para evitar el crecimiento de bacterias potencialmente dañinas en ellos.

Peróxido de hidrógeno y perácidos

Como el cloro, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los perácidos son oxidantes fuertes por lo que pueden ser germicidas potentes de amplio espectro; también son más seguros que el cloro para ser utilizados en humanos y para aplicaciones ambientales. El peróxido de hidrógeno se encuentra en el mercado como una solución al 3% lista para usarse o como solución acuosa al 30% que debe diluirse a 5 –10 veces su volumen con agua estéril. Sin embargo, las soluciones al 3 – 6% de peróxido de hidrógeno solo son

relativamente lentas y de uso limitado como germicidas. Actualmente hay productos que contienen además, otros ingredientes que estabilizan el contenido de peróxido de hidrógeno, aceleran su acción germicida y lo hacen menos corrosivo. El peróxido de hidrógeno puede ser utilizado en la descontaminación de las superficies de trabajo en el laboratorio y en gabinetes de bioseguridad; las soluciones más concentradas pueden usarse para desinfectar dispositivos médicos y quirúrgicos que son sensibles al calor. Para emplear vapores de peróxido de hidrógeno o ácido peracético (CH_3COOOH) para descontaminar dispositivos médicos y quirúrgicos, es necesario disponer de equipo especializado.

Nota: El peróxido de hidrógeno y los perácidos pueden corroer el aluminio, el cobre, el bronce y el zinc y pueden decolorar textiles, cabello, piel y membranas mucosas. Los objetos que se hayan tratado con estos compuestos deben enjuagarse perfectamente antes de que puedan tener contacto con los ojos o membranas mucosas. Deben almacenarse lejos de fuentes de calor y protegerse contra la luz.

Descontaminación ambiental de locales

La descontaminación ambiental de locales, el mobiliario y equipo, requiere una combinación de desinfectantes líquidos y gaseosos. Las superficies pueden descontaminarse con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl), conteniendo 1 g/l de cloro disponible, si se trata de una sanitización ambiental general; para locales en situación de alto riesgo debe utilizarse una solución más concentrada (5 g/l). Para descontaminación general puede usarse una solución conteniendo 3% de peróxido de hidrógeno en sustitución del hipoclorito de sodio.

Las habitaciones y equipo pueden descontaminarse por fumigación con formaldehído gaseoso generado por calentamiento del paraformaldehído o hirviendo formalina. Antes de generar el gas deben sellarse con cinta adhesiva todas las puertas, ventanas y otras salidas del local. La fumigación debe hacerse a temperatura ambiente (21°C) y humedad relativa de 70%. (Ver más abajo “Descontaminación de gabinetes de bioseguridad”). El gas debe entrar en contacto con todas las superficies por descontaminar por lo menos durante 8 hs. Ventilar perfectamente el área después de haber fumigado antes de la entrada del personal. La persona que entre al área fumigada antes de ser ventilada, debe usar un respirador apropiado para evitar el contacto directo de las mucosas nasofaríngeas

con el gas remanente ya que es sumamente irritante. Puede usarse bicarbonato de amonio gaseoso para neutralizar el formaldehído.

Nota: El formaldehído es un irritante poderoso y se ha asociado con la aparición de cáncer por lo que debe protegerse con respiradores que cubran completamente la cara y de ser posible con abastecimiento de aire. Aplica la regla de “dos personas”.

Descontaminación de gabinetes de seguridad biológica

Para la descontaminación de GSB Clase I y Clase II debe colocarse una cantidad adecuada de paraformaldehído (concentración final de 0.8% de paraformaldehído en el aire) en una parrilla eléctrica con placa o un sartén eléctrico, controlados desde afuera. Colocar también dentro del GSB en una parrilla o sartén eléctrico, igualmente controlado desde afuera, una cantidad de bicarbonato de amonio 10% mayor que la del paraformaldehído. Esta segunda parrilla o sartén debe tener una tapa que pueda ser retirada desde afuera (puede atarse con una cuerda y jalarla para destapar el bicarbonato cuando sea necesario) lo anterior evita una prematura neutralización del formaldehído gaseoso...

Si la humedad relativa es menor de 70% debe colocarse dentro del gabinete un recipiente con agua caliente antes de cerrar y sellar la puerta del frente del gabinete con cinta adhesiva resistente (tipo cinta para ductos). Si el gabinete no tiene puerta frontal, cubrir con tela de plástico y cinta adhesiva para evitar que haya fuga del gas hacia el laboratorio.

Encender el interruptor para la parrilla del formaldehído y apagarlo 1 hora después o cuando todo el formaldehído se haya evaporado. Dejar el gabinete así toda la noche. La segunda parrilla o sartén se enciende al día siguiente, después de haber retirado la tapa y se deja vaporizar todo el bicarbonato de amonio; se apaga el interruptor y se enciende el gabinete para permitir la circulación de bicarbonato de amonio gas por 1 hora. Se retira la cinta adhesiva y el gabinete puede ser utilizado nuevamente.

Lavado de manos / descontaminación de manos

Deben usarse guantes apropiados para el trabajo con materiales biológicos peligrosos siempre que sean posibles. Sin embargo, lo anterior no reemplaza la necesidad de que el personal del laboratorio se lave adecuadamente las manos con regularidad. Deben lavarse las manos después de haber manejado material biológico peligroso o animales, después de

ir al baño, antes de salir del laboratorio y antes de comer. En casos comunes, lavarse perfectamente las manos con agua y jabón es suficiente para descontaminarlas, sin embargo, se recomienda el uso de jabones germicidas para situaciones de alto riesgo. Las manos deben cubrirse perfectamente con la espuma del jabón y friccionarlas durante 10 seg, enjuagarlas completamente con agua y secarlas con toalla de papel o de tela (si es posible, utilizar un secador de aire caliente para las manos). Se recomiendan los lavabos que se operan con el pie, si no se dispone de ellos, usar una toalla de papel para cerrar la llave del agua y así evitar la recontaminación de las manos. Como se mencionó más arriba, pueden usarse productos a base de alcohol para frotar las manos si no están muy sucias, o si no es posible lavarse bien las manos. Desinfección en caliente y esterilización

El calor seco (horno a 180° C) puede aplicarse a instrumentos que no se dañen en estas condiciones como acero inoxidable y vidrio.

La manera más efectiva de aplicar calor con el propósito de esterilizar es por medio de autoclave que utiliza una atmósfera saturada de vapor a presión. Para uso general los siguientes ciclos aseguran la esterilización de una carga adecuada en la autoclave:

3 min. A 134° C
10 min. A 126° C
15 min. A 121° C
25 min. a 115° C

Incineración

La incineración es útil para la disposición de los restos de animales así como de partes anatómicas y otros residuos del laboratorio sin que haya necesidad de hacer una descontaminación previa. La incineración de materiales infecciosos es una alternativa a la esterilización por autoclave únicamente en el caso de que el incinerador esté bajo control del mismo laboratorio y cuente con un eficiente control de temperatura y una cámara de quemado secundaria.

El diseño del incinerador debe evitar que algunos materiales que no se destruyen completamente durante la incineración y los efluentes de la chimenea puedan contribuir a la contaminación de la atmósfera con microorganismos, compuestos tóxicos y humo.

Idealmente, la temperatura de la cámara principal no debe ser menor de 800° C y la temperatura de la cámara secundaria, por lo menos 1000° C. Los materiales que se van a incinerar deben transportarse en bolsas de plástico. Hay que hacer notar que la operación eficiente del incinerador depende en gran parte de hacer una carga adecuada de los residuos.

8. Descontaminación de materiales que contienen priones

Los priones que se catalogan como “agentes infecciosos no convencionales” o “agentes de la encefalopatía espongiforme” contienen básicamente proteína y presentan una resistencia poco común ante la mayoría de los agentes físicos y químicos por lo que los materiales que contienen este tipo de agentes infecciosos requieren de un proceso previo antes de su reciclaje o disposición final. Hasta este momento, los datos que se tienen indican que los priones pueden ser inactivados por una solución de 2 mol / l de hidróxido de sodio conteniendo 4.0 ml / l de clorhidrato de guanidina (HNC (NH₂)₂.HCl) o isocianato de guanidina (HNC (NH₂)₂.HNCO) e hipoclorito de sodio (NaOCl) (>2% de cloro disponible) seguido de esterilización en autoclave a 132° C por 4-5 horas. La incineración también es un modo efectivo de tratar los materiales que contienen priones (ver la Hoja de Seguridad de la Encefalopatía Espongiforme Bovina).

Bibliografía básica y complementaria:

LITERATURA RECOMENDADA:

- Tazy Zavla Jorge. 2012. *Microbiología y parasitología Médica* Méndez Editores. 4ª Edición.
- Brooks/ et al. 2011. Jawetz, Melnick y Adelberg, *Microbiología Médica*. McGraw Hill. 25ª edición.

FUENTES ALTERNATIVAS:

- UNAM. 2017. *MICROBIOLOGIA*. Revista mensual. Vol 3

- <http://revistas.unam.mx/index.php/rfm/article/viewFile/12770/12090>
- Jawetz. 2002. Microbiología médica.
http://redlagrey.com/files/Microbiologia_Medica_Jawetz_25_www.rinconmedico.smffy.com.pdf
 - UNAJ.2013. Manual de Microbiología y parasitología.
<https://www.unaj.edu.ar/wp-content/uploads/2018/06/Manual-de-Microbiologia-y-Parasitologia-2013.pdf>
 - Iánez Enrique. 2018. Concepto e historia de la Microbiología.
http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/01_micro.htm
 - UNAM.Recuperado 2018. FACULTAD DE QUÍMICA.
http://depa.fquim.unam.mx/bioseguridad/lineam/linea_desinfeccion.html
 - Molina López. 2018. Generalidades de Micología. Facultad de medicina UNAM.
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.htm>