

MANUAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA DE LA ASOCIACIÓN ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

VOLUMEN I

Bacterias de Importancia Clínica

Editores

HORACIO A. LOPARDO

Consultor Honorario del Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría
"Prof. Dr. Juan P. Garrahan"

Profesor Consulto de Microbiología Clínica. Facultad de Ciencias Exactas.
Universidad Nacional de La Plata

Miembro de la Comisión Directiva de SADEBAC,
Asociación Argentina de Microbiología

SILVIA C. PREDARI

Jefa del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones
Médicas Alfredo Lanari. Universidad de Buenos Aires

Directora de la Revista Argentina de Microbiología, publicación científica oficial
de la Asociación Argentina de Microbiología

Coordinadora del Comité de Emergencias Biológicas de la Red de Hospitales e
Institutos de la Universidad de Buenos Aires

Miembro de la Subcomisión de Bacterias Anaerobias, SADEBAC, Asociación
Argentina de Microbiología

CARLOS VAY

Profesor Asociado de Microbiología Clínica. Facultad de Farmacia y
Bioquímica.

Jefe Laboratorio de Bacteriología Departamento de Bioquímica Clínica.
Hospital de Clínicas "Gral. José de San Martín"

Director Carrera de Especialización en Bacteriología Clínica. Facultad de
Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.



INDICE GENERAL

Parte I. Temas generales de Microbiología Clínica

Parte Ia. Taxonomía bacteriana

Parte Ib. Métodos generales de identificación bacteriana

Partell. Microorganismos aerobios y anaerobios facultativos

Parte IIa. Cocos gram positivos

Parte IIa.1. Cocos gram positivos, catalasa positivos

Capítulo IIa.1.1. *Staphylococcus* spp.

Capítulo IIa.1.2. Otros géneros

Apéndice I. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte IIa.2. Cocos gram positivos, catalasa negativos

Capítulo IIa.2.1. *Streptococcus* β -hemolíticos

Capítulo IIa.2.2. *Streptococcus pneumoniae*

Capítulo IIa.2.3. *Streptococcus* del grupo viridans

Capítulo IIa.2.4. *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Lactococcus*

Capítulo IIa.2.5. *Abiotrophia*, *Granulicatella*, *Gemella*, *Aerococcus* y bacterias relacionadas

Apéndice II. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte IIb. Bacilos gram positivos

Parte IIb.1. Esporulados

Parte IIb.2. No esporulados

Capítulo IIb.2.1. *Corynebacterium* spp. y bacterias relacionadas

Capítulo IIb.2.2. *Listeria*

Capítulo IIb.2.3. *Nocardia*

Capítulo IIb.2.4. Bacilos gram positivos, catalasaneativos

Capítulo IIb.2.5. Micobacterias

Apéndice III. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte IIc. Bacilos gram negativos

Parte IIc.1. Enterobacterias

Capítulo IIc.1.1. Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* diarreigénico

Capítulo IIc.1.2. *Shigella* spp.

Capítulo IIc.1.3. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Cronobacter*, *Raoultella* y *Serratia*.

Capítulo IIc.1.4. *Salmonella*, *Edwardsiella* y *Citrobacter*

Capítulo IIc.1.5. *Proteus*, *Morganella* y *Providencia*

Capítulo IIc.1.6. *Yersinia* y otras enterobacterias.

Apéndice IV. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Capítulo IIc.2. Bacilos gram negativos no fermentadores

Capítulo IIc.2.1. *Pseudomonas*

Capítulo IIc.2.2. *Acinetobacter*

Capítulo IIc.2.3. *Burkholderia*

Capítulo IIc.2.4. *Flavobacterium*, *Chryseobacterium* y *Elizabethkingia*



Capítulo IIc.2.5. *Stenotrophomonas*

Apéndice V. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Capítulo IIc.3. Bacilos gram negativos oxidasa positivos y fermentadores de lactosa

Capítulo IIc.3.1. *Vibrio*

Capítulo IIc.3.2 *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Chromobacterium*

Capítulo IIc.3.3 *Pasteurella*

Apéndice VI. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Capítulo IIc.4. Bacilos gram negativos exigentes

Capítulo IIc.4.1. *Haemophilus*

Capítulo IIc.4.2 Bacilos gram-negativos del grupo ACEK

Capítulo IIc.4.3 *Bordetella*

Capítulo IIc.4.4. *Brucella*

Capítulo IIc.4.5 *Helicobacter*, *Campylobacter* y *Arcobacter*

Apéndice VII. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte IId. Cocos gram negativos

Apéndice VIII. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte IIe. Bacterias atípicas

Capítulo IIe.1 *Bartonella* y *Afipia*.

Capítulo IIe.2 *Legionella* Parte III.3.

Parte IIe.4. *Chlamydia*

Parte IIe.5 Micoplasmas

Parte IIe.6 Rickettsias y otras bacterias relacionadas

Apéndice IX. Métodos de identificación: fundamento y método.

Parte III Microorganismos anaerobios

Parte IIIa. Métodos de cultivo e identificación de microorganismos anaerobios

Parte IIIb. Cocos gram positivos anaerobios

Parte IIIc. Bacilos gram positivos anaerobios esporulados

Parte IIId. Bacilos gram positivos anaerobios no esporulados

Parte IIId. Bacilos gram negativos anaerobios

Parte IIIe. Cocos gram negativos anaerobios

Apéndice X. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.



Parte IIc.1

ENTEROBACTERIAS

Editor responsable

HORACIO A. LOPARDO

Consultor Honorario del Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría
"Prof. Dr. Juan P. Garrahan"

Profesor Consulto de Microbiología Clínica. Facultad de Ciencias Exactas.
Universidad Nacional de La Plata

Miembro de la Comisión Directiva de SADEBAC,
Asociación Argentina de Microbiología



Índice

Capítulo	Título	Pág
Indice general		2
IIc.1	Enterobacterias	4
Índice		5
IIc.1.1	Diagnóstico y caracterización de <i>Escherichia coli</i> diarreigénico	11
	Introducción	12
	<i>Escherichia coli</i> enteropatógeno (EPEC)	14
	Hábitat y epidemiología	15
	Impacto clínico	16
	Factores de virulencia	17
	Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento	20
	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénico (ETEC)	21
	Hábitat y epidemiología	21
	Impacto clínico	23
	Factores de virulencia	23
	Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento	26
	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasivo (EIEC)	28
	Hábitat y epidemiología	28
	Impacto clínico	29
	Factores de virulencia	30
	Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento	33
	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativo (EAEC)	33
	Hábitat y epidemiología	34
	Impacto clínico	35
	Factores de virulencia	35
	Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento	39
	<i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga (STEC)	40
	Hábitat y epidemiología	41
	Impacto clínico	45
	Factores de virulencia	47
	Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento	51
	Aislamiento y caracterización de <i>Escherichia coli</i> diarreigénico	53



	Bibliografía	55
Ilc.1.2	<i>Shigella</i> spp.	73
	Aspectos taxonómicos	74
	Hábitat y aspectos epidemiológicos	75
	Aspectos patogénicos	76
	Marcadores de virulencia	77
	Impacto clínico	79
	Identificación a nivel de género y especie	80
	Examen microscópico	80
	Procesamiento de muestras y características culturales	81
	Pruebas bioquímicas y serológicas	82
	Métodos moleculares	90
	Bibliografía	93
Ilc.1.3	<i>Klebsiella, Enterobacter, Pantoea, Cronobacter, Serratia</i>	100
	Enterobacterias del grupo KES (<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia</i>)	101
	Características generales	105
	Sensibilidad a los antibióticos	107
	Género <i>Klebsiella</i>	111
	Aspectos taxonómicos	111
	Epidemiología, transmisión y significado clínico	112
	Aspectos patogénicos	116
	Características culturales	119
	Identificación a nivel de género y especie	120
	Identificación por métodos moleculares	123
	Sensibilidad a los antibióticos	124
	Género <i>Enterobacter</i>	128
	Aspectos taxonómicos	128
	Epidemiología, transmisión y significado clínico	129
	Aspectos patogénicos	130
	Características culturales	131
	Identificación a nivel de género y especie	132
	Identificación por métodos moleculares	136
	Sensibilidad a los antibióticos	137
	Género <i>Pantoea</i>	139
	Aspectos taxonómicos	139
	Epidemiología, transmisión y significado clínico	139
	Características culturales	140
	Identificación a nivel de género y especie	140



Identificación por métodos moleculares	141
Sensibilidad a los antibióticos	142
Género <i>Cronobacter</i>	143
Aspectos taxonómicos	143
Epidemiología, transmisión y significado clínico	144
Aspectos patogénicos	144
Características culturales	144
Identificación a nivel de género y especie	145
Identificación por métodos moleculares	148
Sensibilidad a los antibióticos	148
Género <i>Serratia</i>	149
Aspectos taxonómicos	149
Epidemiología, transmisión y significado clínico	150
Aspectos patogénicos	152
Características culturales	153
Identificación a nivel de género y especie	155
Identificación por métodos moleculares	158
Sensibilidad a los antibióticos	158
Bibliografía	160

Ilc.1.4	<i>Salmonella, Edwardsiella, Citrobacter</i>	177
	<i>Salmonella</i>	178
	Aspectos taxonómicos	178
	Hábitat	180
	Significado clínico	181
	Aspectos patogénicos	184
	Características culturales	189
	Identificación a nivel de género, especie, subespecie y serovariedades	192
	Sensibilidad a los antibióticos	212
	<i>Edwardsiella</i>	218
	Aspectos taxonómicos	218
	Hábitat	218
	Significado clínico	218
	Características culturales	219
	Identificación a nivel de género y especie	220
	Sensibilidad a los antibióticos	223
	<i>Citrobacter</i>	224
	Aspectos taxonómicos	224
	Hábitat	224
	Significado clínico	224
	Características culturales	225
	Identificación a nivel de género y especie	226
	Sensibilidad a los antibióticos	229



	Bibliografía	231
Ilc.1.5	<i>Proteus, Morganella y Providencia</i>	238
	Introducción	239
	Aspectos taxonómicos	240
	Género <i>Proteus</i>	242
	Habitat	244
	Aspectos patogénicos	244
	Significado clínico	253
	Identificación a nivel de género y especie	254
	Sensibilidad a los antibióticos	262
	Género <i>Morganella</i>	267
	Habitat	270
	Aspectos patogénicos	270
	Significado clínico	271
	Identificación a nivel de género y especie	272
	Sensibilidad a los antibióticos	274
	Género <i>Providencia</i>	275
	Habitat	276
	Aspectos patogénicos	277
	Significado clínico	277
	Identificación a nivel de género y especie	278
	Sensibilidad a los antibióticos	281
	Bibliografía	283
Ilc.1.6	Género <i>Yersinia</i> y otras enterobacterias	293
	Género <i>Yersinia</i>	294
	Aspectos taxonómicos	294
	Características culturales	294
	Importancia clínica e identificación a nivel de especie	295
	Factores de virulencia	296
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	297
	Hábitat, aspectos epidemiológicos e importancia clínica	297
	Características culturales	299
	Aspectos patogénicos	300
	Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento	302
	<i>Yersinia pestis</i>	303
	Aspectos taxonómicos	303
	Importancia clínica y epidemiología	303
	Diagnóstico microbiológico	307
	Patogenia	307
	Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento	308



Vacunas	309
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	310
Importancia clínica y epidemiología	310
Serotipificación y tipificación molecular	311
Sensibilidad a los antibióticos	312
Bibliografía	312
 <i>Budvicia</i>	322
Aspectos taxonómicos	322
Características microbiológicas	322
Habitat, importancia clínica y sensibilidad a los antibióticos	322
<i>Buttiauxella</i>	323
Aspectos taxonómicos	323
Hábitat e importancia clínica	323
Características microbiológicas	324
Sensibilidad a los antibióticos	324
<i>Cedecea</i>	325
Aspectos taxonómicos	325
Hábitat	326
Características microbiológicas	326
Importancia clínica	327
Sensibilidad a los antibióticos	329
<i>Ewingella</i>	330
Características microbiológicas	330
Aspectos taxonómicos, hábitat e importancia clínica	331
Sensibilidad a los antibióticos	331
<i>Hafnia</i>	332
Aspectos taxonómicos	332
Características microbiológicas	332
Hábitat, epidemiología e importancia clínica	335
Sensibilidad a los antibióticos	337
<i>Kluyvera</i>	338
Aspectos taxonómicos	338
Hábitat	338
Características microbiológicas	338
Epidemiología e importancia clínica	339
Sensibilidad a los antibióticos	342
<i>Leclercia</i>	343
Aspectos taxonómicos, hábitat e importancia clínica	343
Características microbiológicas	344
Sensibilidad a los antibióticos	344
<i>Leminorella</i>	345
Aspectos taxonómicos, hábitat e importancia clínica	345
Características microbiológicas	346
Sensibilidad a los antibióticos	346



	<i>Photorhabdus</i>	346
	Aspectos taxonómicos, hábitat e importancia clínica	346
	Características microbiológicas	348
	Patogenia	349
	Sensibilidad a los antibióticos	350
	<i>Rahnella</i>	350
	Aspectos taxonómicos y características microbiológicas	350
	Hábitat e importancia clínica	351
	Sensibilidad a los antibióticos	352
	<i>Tatumella</i>	353
	Aspectos taxonómicos	353
	Características microbiológicas	353
	Hábitat e importancia clínica	354
	Sensibilidad a los antibióticos	355
	<i>Yokenella (Koserella)</i>	355
	Aspectos taxonómicos	355
	Hábitat e importancia clínica	356
	Características microbiológicas	356
	Sensibilidad a los antibióticos	357
	Otras enterobacterias	359
	Bibliografía	359
Apéndice IV.	Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.	378
	Agar hierro tres azúcares (TSI)	378
	Agar lisina hierro (LIA)	381
	Prueba de la oxidasa	383
	Agar SIM	385
	Prueba de indol	387
	Prueba de β -galactosidasa (ONPG)	390
	Pruebas de utilización de azúcares	392
	Prueba de utilización del citrato (citrato de Simmons)	395
	Pruebas de descarboxilasas y de arginina dihidrolasa	398
	Prueba del malonato	401
	Prueba del rojo de metilo	404
	Prueba de Voges Proskauer	406
	Prueba de la fenilalanina desaminasa	408
	Prueba de la ureasa	411
	Prueba del mucato	413
	Prueba de la DNasa	414
	Prueba de la utilización del acetato	415



Capítulo II.c.1.1

Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* diarreigénico

MARTA RIVAS, ELIZABETH MILIWEBSKY, BEATRIZ DASTEK

Servicio Fisiopatogenia, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas,

ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, Buenos Aires



Introducción

A nivel mundial, la enfermedad diarreica constituye un problema grave para la salud pública de infantes y niños, con altas tasas de morbilidad y mortalidad, especialmente en países en vías de desarrollo.

Las diarreas de origen infeccioso pueden ser de etiología bacteriana, viral o parasitaria y son frecuentes las asociaciones de dos o más agentes. Entre los agentes bacterianos se puede señalar a *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Yersinia* spp., *Campylobacter* spp., *Clostridium difficile* y *Escherichia coli* diarreigénico, entre otros.

Escherichia coli es una enterobacteria de localización ubicua. Fue descrita por primera vez en 1885 por el pediatra alemán Theodore von Escherich, quien la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente, la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor.

Escherichia coli es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo con un metabolismo tanto fermentativo como respiratorio. Puede ser inmóvil o móvil por flagelos peritricos. Constituye el habitante facultativo del intestino grueso más importante, tanto del hombre como de animales de sangre caliente y es el anaerobio facultativo predominante en el intestino y es parte de la microbiota que mantiene la fisiología en el hospedador sano.

Es miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, y aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* no son patógenas, pueden ser patógenos oportunistas que causan infecciones en el hospedador inmunocomprometido. Fisiológicamente, *E. coli* es versátil, está adaptado a las características del hábitat y puede crecer en un medio con glucosa como única fuente orgánica. Puede crecer en



presencia o ausencia de O₂ y bajo condiciones anaeróbicas puede proliferar por fermentación, produciendo una mezcla de ácidos y gas como productos finales. Puede también crecer por medio de una respiración anaeróbica ya que es capaz de utilizar NO₃, NO₂ o fumarato como aceptores finales de electrones mediante procesos respiratorios de transporte de electrones. Esta versatilidad de *E. coli* le confiere habilidad para adaptarse al hábitat intestinal (anaeróbico) y extraintestinal (aeróbico o anaeróbico). Los aislamientos se diferencian serológicamente por los antígenos somático (O), flagelar (H) y capsular (K). Hasta el presente se identificaron más de 174 antígenos O, 56 H y 80 K, con más de 700 serotipos (basados en las combinaciones de los antígenos O, H y K), muchos de ellos asociados con enfermedad humana. Se han descrito 8 categorías distintas (patotipos o patovares), los cuales están clasificados dentro de *E. coli* diarreigénico (DEC) o *E. coli* extraintestinal (ExPEC). Dos patotipos son extraintestinales, *E. coli* uropatogénico (UPEC) y *E. coli* de la meningitis neonatal (NMEC). Los otros 6 patotipos corresponden a los DEC.

Con el nombre de *E. coli* diarreigénico (DEC) se denomina a un grupo heterogéneo de cepas que poseen distintos factores de virulencia y distinta interacción con la mucosa intestinal del hospedador, causan diferentes síndromes diarreicos y tienen distinta epidemiología. Las cepas DEC son causa importante de morbimortalidad en los países en vías de desarrollo. Hasta el presente se reconocen seis categorías o patotipos: *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC), *E. coli* enteroagregativo (EAEC) y *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC). La capacidad patogénica y la implicación epidemiológica de la sexta categoría,



llamada *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), no está lo suficientemente dilucidada.

***Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC)**

El reconocimiento de *E. coli* enteropatógeno como agente causal de diarrea humana, fue realizado en 1945 por John Bray¹⁴, quien describió la asociación de la infección con cepas de *E. coli*, antigénicamente homogéneas, con brotes de diarrea infantil. En ese mismo período, Varela et al.¹⁴⁷ describieron la asociación de una cepa de *E. coli* llamada "*E. coli-gomez*", con un caso de diarrea mortal en un niño en México. En 1955, Neter et al.⁸⁷ crearon el término *E. coli* enteropatógeno (EPEC) para designar a cepas de *E. coli*, relacionadas epidemiológicamente con la diarrea infantil y diferenciarlas de las cepas de *E. coli* de la microbiota normal. El potencial patogénico de EPEC fue confirmado cuando se observaron síntomas evidentes de diarrea en experimentos de infección oral en adultos voluntarios⁶⁸.

En 1987, la Organización Mundial de la Salud¹³⁸ definió como EPEC a cepas de *E. coli* pertenecientes a 12 grupos con diferente antígeno somático O: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142, O158. En la actualidad, el patotipo EPEC se divide en EPEC típico (tEPEC) y EPEC atípico (aEPEC). Esta clasificación se basa en la presencia del factor de virulencia EAF (del inglés, *EPEC adherence factor*) presente en tEPEC y ausente en aEPEC⁵⁸.



Hábitat y epidemiología

Estudios realizados en todo el mundo han demostrado que las cepas tEPEC están fuertemente asociadas con diarrea en niños menores de un año de edad, principalmente en niños pobres de los centros urbanos, en los primeros seis meses de vida⁸⁶. En este grupo de edad, las cepas tEPEC se consideran la principal causa de diarrea endémica en países en desarrollo¹³⁹. La frecuencia de infección por tEPEC en niños mayores de un año disminuye con la edad y los adultos rara vez tienen infecciones por EPEC⁸⁶. El aumento de la resistencia a la infección en niños mayores y adultos se atribuye al desarrollo de inmunidad o a la pérdida de receptores específicos para algunas adhesinas⁸⁶. Desde la década del 60, en los países desarrollados se ha observado una importante disminución en la frecuencia de tEPEC y desde entonces estas bacterias se han detectado en raras ocasiones³. Entre las probables razones de esta disminución se incluyen un mejor control de las infecciones hospitalarias, mejores tratamientos y adecuadas medidas de saneamiento¹⁴³. Sin embargo, en esas regiones, las cepas de aEPEC se detectan con frecuencia en casos de diarrea en distintos grupos etáreos y en pacientes adultos con VIH-SIDA^{41, 86}. En algunos estudios, la frecuencia de detección de cepas aEPEC es similar en individuos con y sin diarrea. Por lo tanto, aún no se ha demostrado una fuerte asociación de los serotipos aEPEC con diarrea endémica. Por otra parte, algunos serotipos han sido incriminados como agentes en brotes de diarrea.

Hasta el presente, algunos estudios han demostrado que tEPEC rara vez se detecta en animales y su reservorio comprende sólo a los seres



humanos ¹⁴³. Muchos niños adquieren la infección en hospitales, generalmente por contacto con otros pacientes hospitalizados por diarrea. A pesar de que no está completamente dilucidado, es evidente que tEPEC puede ser transmitido por la ingestión de alimentos y agua contaminados. La sustitución de la lactancia materna por la alimentación con mamadera aumenta el riesgo de contraer diarrea¹⁰. En contraste, varios informes han descrito el aislamiento de cepas aEPEC de diferentes especies de animales con o sin diarrea, como vacas, ovejas, cabras, cerdos y aves de corral, como así también en animales domésticos, venados y monos tití. Aunque no hay evidencia de transmisión directa de animales a humanos, algunas cepas aEPEC aisladas de animales pertenecen a serogrupos implicados en enfermedad humana como por ejemplo, O26, O103, O119, O128 y O142⁵¹. Esto sugiere que estos animales podrían constituir un reservorio importante de aEPEC a partir de los cuales estas cepas podrían transmitirse a los seres humanos.

Impacto clínico

La infección por EPEC varía desde una portación subclínica a una infección fatal, probablemente en función de factores del hospedador⁸⁶. Varios estudios han demostrado que las cepas tEPEC pueden inducir abundante diarrea secretora con moco pero sin sangre, con pérdidas importantes de líquidos y electrolitos en las heces. Se observan también vómitos y fiebre leve. Además, la infección por EPEC puede conducir a una mala absorción de nutrientes dando lugar al agravamiento de la desnutrición y la persistencia de la diarrea³³. Estudios realizados en voluntarios adultos indicaron que es necesaria



una dosis infectiva alta para inducir diarrea (10^9 y 10^{10} bacterias), pero en niños se presume que es mucho más baja⁸⁶. Los voluntarios adultos que ingirieron grandes cantidades (10^9 a 10^{10}) de EPEC presentaron períodos cortos de incubación (12 a 24 h)^{36, 57}.

La presencia de la lesión característica en las células intestinales conocida como A/E (del inglés, *attaching/effacing*), de adherencia y borrado de las microvellosidades, parece estar asociada con la secreción de fluidos y el desarreglo del sistema de enzimas digestivas, lo que conduce a la mala absorción de nutrientes. Después de la infección por EPEC se ha observado edema, infiltración de neutrófilos y reducción de la actividad enzimática en la mucosa intestinal¹³⁶.

En voluntarios convalecientes de una infección experimental por EPEC, y en niños mayores de un año de edad se ha demostrado respuesta de anticuerpos contra el antígeno O de algunos serogrupos^{69, 87}. Además, EPEC mostró inducir respuesta inmune en suero (IgG e IgM), leche, calostro y saliva (IgA) en humanos sanos y enfermos y en el calostro de bovinos^{94, 126}. Estos hallazgos sugieren que la reducción en la frecuencia de infección por tEPEC en niños mayores de 2 años de edad podría deberse en parte al desarrollo de anticuerpos anti-EPEC.

Factores de virulencia

Después de pasar la barrera gástrica, las cepas EPEC se adhieren a la mucosa del intestino delgado y grueso. El proceso de colonización se divide en tres etapas⁸⁶. La primera etapa es superficial y no íntima y los factores que



median la adherencia inicial no han sido totalmente caracterizados. Algunos estudios indican la posible participación de fimbrias tipo IV, llamadas BFP (del inglés, *bundle forming pilus*), de otras estructuras fimbriales y afimbriales y flagelos⁵⁹.

Después de la adherencia inicial, participa un sistema de secreción tipo III (T3SS, del inglés *Type three Secretion System*) que codifica varias proteínas efectoras (Eps), cuyos efectos de señalización promueven alteraciones en el epitelio del hospedador^{26, 137}. Por último, existe una adherencia íntima que culmina con la lesión hispatológica característica A/E. Morfológicamente, esta lesión incluye el borrado de las vellosidades intestinales y la formación de una estructura en forma de pedestal, rica en actina sobre la cual se adhieren las bacterias EPEC. La destrucción de las microvellosidades y la reducción de la superficie absorptiva provocan una secreción neta de agua y electrolitos, sin invasión.

Las cepas tEPEC producen el llamado patrón de adherencia localizada (LA) sobre la superficie de las células HeLa/HEp-2¹¹⁵, con formación de microcolonias compactas en la superficie celular. Esta adherencia está mediada por el BFP, codificado en el plásmido pEAF⁴⁰. Por el contrario, la mayoría de las cepas aEPEC producen un patrón modificado de LA denominado LAL (*LA like*)¹⁰⁷, en el que se observa un número menor de bacterias sobre las células. Los filamentos del BFP interconectan las bacterias EPEC para promover la adherencia no íntima de EPEC a los enterocitos²¹.

La intimina es necesaria para la adherencia íntima de las bacterias a las células epiteliales y para la desorganización del citoesqueleto¹⁴². Es una proteína de membrana externa de 94 kDa, codificada en el gen *eae* del *locus*



LEE (del inglés, *locus of enterocyte effacement*). Basándose en diferencias en la secuencia de nucleótidos de la porción C-terminal de la molécula, se han descrito más de 27 subtipos de intimina¹⁵⁵. Estos subtipos se nombran con letras griegas. Los subtipos α y β son los más comunes entre las cepas tEPEC, mientras que los subtipos α , β , ζ , δ , y ϵ , parecen ser los más frecuentes entre las cepas de los serotipos aEPEC¹¹. Algunos estudios *in vitro* sugieren que diferentes subtipos de intimina pueden determinar el tropismo por diferentes sitios intestinales¹⁰². La parte variable expuesta de la molécula de intimina se conecta a su proteína receptora Tir (receptor translocador de intimina), la cual es previamente traslocada dentro del citosol de la célula eucariota blanco a través del T3SS. Después de su translocación, el Tir es insertado en la membrana plasmática exponiendo su parte media en la superficie celular como un bucle para unirse finalmente a la proteína intimina.

El factor inhibitorio de linfocitos (LiFa) es una proteína de superficie de tEPEC, que inhibe la proliferación de linfocitos y la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias⁶⁴. El factor Efa1/LifA (factor de adherencia 1 de STEC) parece contribuir a la adherencia de las cepas aEPEC a las células epiteliales en ausencia de BFP. Recientemente, se demostró que el *pilus* común de *E. coli* (ECP, del inglés *E. coli common pilus*), puede actuar en forma conjunta con el BFP para estabilizar las interacciones entre tEPEC y las células del hospedador¹⁰⁴. Los flagelos contribuyen a la virulencia de las bacterias patógenas a través de la movilidad, la quimiotaxis, adherencia, y la estimulación de la liberación de interleuquina 8 (IL-8)¹⁰³.



Identificación y caracterización de factores de virulencia

En la actualidad, los ensayos moleculares son los métodos más apropiados para la identificación de EPEC. Estos métodos incluyen PCR únicas o múltiples para detectar pEAF (81), *bfpA* (que codifica para la subunidad mayor de BFP), *eae* y otros genes del *locus* LEE². Las cepas de tEPEC y aEPEC se diferencian principalmente por la presencia en el primer grupo de la secuencia EAF y/o del gen *bfpA*.

Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento

La terapia de rehidratación oral reduce notablemente la mortalidad temprana y es el tratamiento más eficaz en las infecciones leves por EPEC. Sin embargo, se ha demostrado que los niños con infección por EPEC que no responden a esta terapia, requieren hospitalización³³. Probablemente esto es debido a los daños causados en la mucosa intestinal, la cual puede requerir tiempo para recuperar sus funciones (digestión, absorción, y defensa)⁸⁶. La terapia con antibióticos sólo se recomienda para los casos más graves o en casos de diarrea persistente asociada con aEPEC⁹¹. La lactancia materna tiene un efecto protector debido probablemente al efecto cooperativo de la IgA con la presencia de oligosacáridos²⁴. Además de la lactancia materna, las medidas apropiadas de higiene y alimentación pueden prevenir la infección de los niños en los países en desarrollo¹²⁹. La inmunización contra EPEC podría ser otra



estrategia probable de prevención. Sin embargo, actualmente no hay disponible ninguna vacuna con licencia para los seres humanos contra las infecciones por EPEC.

***Escherichia coli* enterotoxigénico(ETEC)**

En 1971, *E. coli* enterotoxigénico, fue asociado por primera vez a casos de diarrea en adultos¹¹². Posteriormente ETEC fue considerado como una causa importante de diarrea en el viajero adulto de los países desarrollados y en niños en los países en desarrollo⁷⁸.

Hábitat y epidemiología

ETEC se detecta con mayor frecuencia entre los viajeros que visitan América Latina y el Caribe en comparación con aquellos que viajan a África o Asia. La colonización y la diarrea asociada a ETEC disminuyen con las estadías prolongadas y las tasas en viajeros se asemejan a las tasas de colonización e infección por ETEC observadas en los habitantes de zonas endémicas. Sin embargo, la inmunidad en viajeros que visitan países en desarrollo es de corta duración cuando las exposiciones no son repetidas.

En los países en desarrollo, ETEC es el patógeno bacteriano más común identificado en niños menores de 5 años con diarrea aguda. Se estima que anualmente es responsable de 200 millones de casos de diarrea en todo el mundo con aproximadamente 150.000 muertes¹⁵¹. ETEC puede causar



infecciones recurrentes en niños, en particular en menores de 24 meses. Los niños mayores y los adultos son menos susceptibles, pero también pueden experimentar diarrea con deshidratación.

Los aislamientos de ETEC expresan una gran variedad de antígenos O y H. En un trabajo realizado por Wolf *et al.* en 1997¹⁵², se investigó la frecuencia de distribución de los antígenos O, H, los factores de colonización (CFA, del inglés, *colonization factor antigen*), y las toxinas termolábil (LT) y termoestable (ST), en 954 cepas de ETEC aisladas en diferentes regiones del mundo. Al analizar individualmente los serogrupos observaron que O6, O8, O78, O128 y O153 se detectaban en más del 50% de los aislamientos. Mientras que al analizar conjuntamente serotipo, CFA y toxinas, el perfil O6:H16 CFA/II LT/ST fue el más frecuente (11%), seguido por los perfiles O153:H45 CFA/I ST, O78:H12 CFA/I ST, O148:H28 CFA/IV ST, O8:H9 CFA/II LT/ST, O27:H7 CFA/IV ST, y O169:H2 CFA/IV ST en un 24% del total de los aislamientos. En otro estudio realizado en Japón¹⁵⁴, 79 cepas de un total de 1.130 aislamientos fueron ETEC por identificación molecular de los factores de virulencia y los serogrupos O126, O27 y O169 fueron los más frecuentemente detectados.

Distintas investigaciones epidemiológicas han demostrado la implicación del agua y alimentos contaminados como vehículos de la infección por ETEC. Se han detectado niveles altos de contaminación por ETEC en muestras de agua y de alimentos tomadas de áreas endémicas. En países en desarrollo, la contaminación fecal del agua y de los alimentos constituye la principal causa de la alta incidencia de diarrea por ETEC. Otros estudios realizados con adultos voluntarios permitieron establecer que era necesaria una dosis de 10^8 a 10^{10} unidades formadoras de colonias para causar diarrea¹⁵¹.



Impacto clínico

La diarrea asociada a la infección por ETEC se presenta en forma profusa con un corto período de incubación (14 a 50 h), de característica acuosa, sin sangre ni mucus. Fiebre y vómitos se presentan con muy baja frecuencia. La diarrea puede ser leve, breve y autolimitarse o puede resultar severa como la observada en las infecciones graves por *V. cholerae*.

Factores de virulencia

Antes de producir diarrea, las cepas ETEC deben adherirse a las células epiteliales de la mucosa del intestino delgado a través de una interacción mediada por adhesinas proteicas conocidas como factores de colonización (CFs). Estos factores se clasifican según su especificidad antigénica en factores antigénicos de colonización (CFA), antígenos de superficie de *E.coli* (CS, del inglés, *coli surface*) y factores probables de colonización (PCF, del inglés *putative colonization factor*). Luego de la colonización, ETEC se caracteriza por la capacidad de producir una y/o dos enterotoxinas conocidas como LT y ST.

Los CFs que intervienen en la adherencia y en la colonización del intestino delgado pueden tener una estructura fimbrial, nofimbrial, helicoidal, o fibrilar. Se han identificado más de 25 factores diferentes, los cuales se clasifican según su antigenicidad, peso molecular, secuencia de aminoácidos de la región N-terminal y también de acuerdo a la morfología estructural. CFA/I,



CFA/II (compuesto por CS1, CS2 y CS3, en diferentes combinaciones), CFA/III, y CFA/IV (compuesto por CS4, CS5, y CS6), CS7, CS17, CS19, CS20, CS22 y los PCFO9, PCFO20, PCFO148, PCFO159 y PCFO166 constituyen los CFs más frecuentes expresados por cepas ETEC que infectan al hombre¹⁴⁴. Sin embargo, la distribución de los CFs entre cepas ETEC varía geográficamente. Mientras CFA/I es el fenotipo más comúnmente identificado en Chile¹⁴⁹, CFA/II y CFA/IV son los más comúnmente identificados en Egipto¹⁰⁶. Cada factor de colonización está constituido por una subunidad proteica codificada en un plásmido de alto peso molecular. En diferentes trabajos se ha observado que la mayoría de los factores están asociados con un número limitado de serotipos y tipos de toxina. La interacción entre los CFs y los receptores de tipo oligosacárido presentes en la superficie de la célula epitelial, es específica de hospedador. Por lo tanto, los CFs que expresan las cepas ETEC que causan infección en humanos son diferentes a los expresados por aquellas cepas que infectan animales.

La toxina LT induce diarrea secretora y respuesta inmunológica con anticuerpos neutralizantes. Es además un importante adyuvante inmunológico dado que posee un peso molecular de 86 kDa. LT está estrechamente relacionada con la toxina de *V. cholerae*, ya que comparte con ésta una homología del 82% en la secuencia de aminoácidos. La toxina es una holotoxina pentamérica compuesta por 5 subunidades B de 11,5 kDa cada una, y una subunidad A de 28 kDa. Las 5 subunidades B forman un anillo que se une específicamente a un receptor de tipo gangliósido (GM1 y GD1b) presente en la superficie del epitelio intestinal. Después de la unión, la toxina endocitada llega a través del mecanismo de transporte retrógrado del aparato de Golgi a la



membrana basal de la célula. La subunidad A (péptido A1) se libera en el citosol, y en virtud de su actividad de ribosilación, activa a la enzima adenilato ciclasa (ADP), la cual eleva el nivel de AMP cíclico intracelular³⁹. Este aumento activa a una quinasa que fosforila los canales de cloruro de la membrana apical. El resultado final es la estimulación de la secreción de iones cloruro y la inhibición de la absorción de NaCl. Este incremento de iones hace que por ósmosis aumente el contenido acuoso en el lumen intestinal provocando la diarrea. LT se puede clasificar en dos grandes tipos conocidos como LT-I y LT-II. Ambos difieren en la afinidad por el hospedador y también en sus secuencias genéticas. LT-I es expresada en cepas que son patógenas tanto para humanos como para animales, y puede ser subclasificada en LTH (derivadas de humanos) y LTP (derivadas del cerdo). Las LT-I son genéticamente diversas, con más de 16 subtipos distintos descritos⁶⁷. LT-II es reconocida principalmente en cepas aisladas de animales y raramente en aquellas que infectan al hombre.

La toxina ST, que también produce diarrea secretora, es un péptido de 18-19 aminoácidos con un peso molecular de 2 kDa. Hay dos tipos principales: STa que se identifica sobre todo en heces humanas, y STb que se identifica en heces animales. Diversas bacterias entéricas como *Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter freundii*, y *Klebsiella pneumoniae* elaboran ST idénticas o altamente homólogas³⁸. Sin embargo, la importancia clínica de ST en otras enterobacterias sigue siendo desconocida. Una vez liberada en el lumen del intestino delgado, ST se une de forma reversible al dominio extracelular de la guanilato ciclasa (GC-C) presente en las células epiteliales de vellosidades y criptas. Esta interacción activa el dominio catalítico intracelular de GC-C que



conduce a la acumulación intracelular de GMP cíclico (cGMP)¹²¹. Al igual que el efecto resultante por la acción de LT, el aumento de cGMP altera el transporte de membrana, mediante la activación de quinasas específicas, que producen la fosforilación, ya sea de los canales de iones o de las proteínas reguladoras asociadas. Esto conduce a la alteración del flujo bidireccional de agua y electrolitos a través de la membrana apical de la célula epitelial provocando diarrea acuosa.

Además de LT y ST, se han descrito otras probables toxinas, como la serina proteasa autotransportadora (EatA) que actúa como una proteasa extracelular. Esta enzima posee especificidad y actúa escindiendo oligopéptidos. Estos oligopéptidos escindidos son sustratos de la proteína catepsina G, que a su vez modula y se une a una amplia gama de otros productos extracelulares, incluyendo proteoglicanos y a la superficie celular dañando la superficie de las células epiteliales⁹⁸.

Identificación y caracterización de factores de virulencia

La caracterización de los genes que codifican LT y ST se realiza mediante la técnica de PCR con oligonucleótidos específicos a partir de cultivos de materia fecal. También pueden utilizarse enzimoimmunoensayos (ELISA) para la detección de LT, ST, CFs, y anticuerpos anti-LT y anti-CFs.

Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento



El tratamiento de la enfermedad diarreica por ETEC en edad pediátrica es el mismo que para otras diarreas agudas secretoras. La corrección y el mantenimiento de la hidratación es siempre la intervención más importante. No se recomienda la terapia antimicrobiana en niños.

Para el tratamiento de la diarrea del viajero, existen numerosos agentes antimicrobianos disponibles. La elección de los antimicrobianos depende de la epidemiología de la región visitada, los patrones de resistencia microbiana, el perfil de seguridad a los antimicrobianos, y las posibles interacciones esperadas. La rifaximina, las fluoroquinolonas y la azitromicina son los antimicrobianos que se utilizan con mayor frecuencia.

En general, se recomienda a los viajeros que mantengan las condiciones de higiene personal, que no beban agua de grifo y utilicen agua envasada, Además, deben lavar y cocinar bien los alimentos. Aunque no se recomienda de manera rutinaria, la profilaxis con antibióticos es muy eficaz en la prevención de la diarrea asociada a ETEC³⁰, pero su utilización debe limitarse a los casos de viajeros con mayor riesgo de padecer la enfermedad o sus complicaciones.

Las infecciones recurrentes por ETEC en niños de países en desarrollo inducen una inmunidad protectora, lo cual se refleja en la disminución de las tasas de diarrea por ETEC con el aumento de la edad. Estos datos sugieren que la vacunación contra ETEC puede ser una estrategia efectiva de prevención, no sólo contra ETEC, sino también contra otros enteropatógenos.

El desarrollo de vacunas contra ETEC se ha basado en la utilización de inmunógenos como los tres principales CFA (CFA/I, CFA/II, y CFA/IV), la toxina LT, o el uso de células bacterianas enteras muertas que expresan CFA. A diferencia de las fimbrias o la LT, la toxina STa tiene un bajo poder



inmunogénico. Sin embargo, esa propiedad podría incrementarse utilizando un adyuvante o una proteína fuertemente inmunogénica como la LT. La heterogeneidad geográfica y temporal de los factores de colonización y los subtipos de LT y ST constituyen un importante desafío para el desarrollo de una vacuna efectiva para ETEC.

***Escherichia coli* enteroinvasivo (EIEC)**

E. coli enteroinvasivo (EIEC) causa diarrea acuosa y disentería en los seres humanos. Las cepas de esta categoría, por sus características bioquímicas, genéticas y de virulencia, están muy relacionadas con *Shigella* spp. Es por ello que todo el conocimiento sobre la patogenia de EIEC ha sido obtenido en su mayoría de estudios sobre *Shigella*⁹⁶.

Hábitat y epidemiología

Tanto para EIEC como para *Shigella*, los humanos infectados son considerados el principal reservorio. En estudios de brotes asociados a la infección por EIEC se observó que el patógeno suele ser transmitido por alimentos o agua contaminada, aunque la transmisión persona a persona también ha sido descrita⁴⁹. La dosis infectiva de EIEC, detectada en voluntarios, fue superior a la de *Shigella* spp.³¹. Coincidentemente, fue menor la capacidad de transmisión persona a persona.

La enfermedad esporádica endémica se presenta en algunas áreas, por lo general donde *Shigella* spp. también es frecuente⁶³. Se ha descrito que estas



áreas endémicas se caracterizan por tener condiciones sanitarias y de higiene deficientes. Esto podría explicar la baja incidencia que existe en los países desarrollados. De todas maneras se han reportado brotes ocasionales de origen alimentario, como por ejemplo el ocurrido en un restaurante en una ciudad de Texas que involucró a 370 personas⁴³.

Los serogrupos O28ac, O29, O112ac, O124, O135, O136, O143, O144, O152, O159, O164, y O167 fueron descritos como los más frecuentes para EIEC^{9, 18}.

Según datos epidemiológicos de diferentes partes del mundo, se observa que existe una asociación entre los serotipos y la región geográfica estudiada. En Alemania, país considerado no endémico para la diarrea por EIEC, fueron detectados aislamientos de O124:H- y O124:H30 importados de países de Europa oriental donde son prevalentes⁹. En un estudio de casos y controles realizado en Chile se detectaron cepas EIEC en 17 de 912 (1,9%) y en 3 de 1.112 (0,3%) muestras de casos de niños con diarrea y de controles, respectivamente. Los serogrupos detectados fueron: O28ac, O124, O143, y O144³⁵. En la Argentina se detectaron los serogrupos O28 (n=38), O124 (n=23), O143 (n=12), O136 (n=5), O112 (n=4), O18 (n=2), O29 (n=2), O44 (n=2), y O144 (n=2), en 120 cepas de EIEC aisladas durante el período 1994-2003²⁰.

Impacto clínico

Clínicamente, la diarrea por EIEC, se presenta con elevada fiebre y disentería con sangre y pus. El extendido de materia fecal presenta abundantes



leucocitos y a veces piocitos, característicos de una diarrea de tipo inflamatorio. Al igual que *Shigella* spp., EIEC tiene la capacidad de invadir el epitelio del intestino grueso, multiplicándose en las células del enterocito, produciendo ulceración de la mucosa y muerte celular. Como consecuencia de la invasión celular, las cepas de EIEC provocan una respuesta inflamatoria importante asociada a la destrucción de la mucosa intestinal.

La característica principal de EIEC y de *Shigella* es que presentan un plásmido Ipa (del inglés, *invasion plasmid antigen*) cuyos genes están involucrados en la invasión del epitelio intestinal y en la capacidad de diseminarse de célula a célula. El modelo que describe la patogenia muestra que la bacteria atraviesa el epitelio invadiendo las células M e interactuando después con los macrófagos. La bacteria puede inducir la apoptosis de estas células evadiendo la vacuola fagocítica. De esta manera, puede acceder a la superficie basolateral del epitelio e invadir al enterocito. Dentro de la célula epitelial, la bacteria puede lisar la vacuola endocítica y multiplicarse en el citoplasma. También puede inducir el reordenamiento del citoesqueleto y la polimerización de la actina por la acción de una proteína de membrana externa, y migrar para alcanzar la membrana de la célula vecina. La apoptosis en macrófagos genera la liberación de citoquinas como IL-1 e IL-8. Estas interleuquinas incrementan la reacción inflamatoria atrayendo a los monocitos al sitio de la infección, los cuales, al migrar a través de la barrera epitelial, facilitarían aún más la invasión por EIEC ⁹⁶.

Factores de virulencia



Los genes necesarios para la invasión están codificados en el *locus i* (del inglés, *invasion-associated locus*) en el plásmido Ipa de 140-MDa. Este *locus* codifica las proteínas IpaA, IpaB, IpaC, IpaD, e IpgC (proteína chaperona de IpaB y de IpaC). Las proteínas efectoras son secretadas por el sistema MXI-Spa tipo III que también está codificado en el plásmido de invasión. IpaB, IpaC, e IpaD juegan un papel esencial en la entrada de la bacteria, mientras que IpaA está sólo parcialmente involucrada en la invasión. El complejo Ipa puede unirse a la integrina $\alpha 5 \beta 1$ y promover la invasión a las células epiteliales. IpaB se une al receptor de hialuronato CD44 y a la caspasa-1. El complejo IpaB-IpaC se inserta en las membranas de las células epiteliales, formando un poro que permite la translocación de proteínas efectoras, como IpaA. El proceso desencadena una serie de eventos de transducción en las células epiteliales. Después de la invasión, EIEC lisa la vacuola endocítica y se libera en el citosol. Rápidamente se recubre de actina filamentosa, dejando una cola de actina en un polo de la bacteria. Estas prolongaciones de actina confieren a la bacteria la capacidad de moverse en el citosol de la célula huésped y dentro de la célula adyacente. Este mecanismo requiere de la expresión de la proteína IcsA/Virg. IcsA es una proteína autotransportadora de 120 kDa, que recluta componentes citoplasmáticos de la célula huésped para inducir la polimerización de actina. Su ubicación asimétrica asegura que el montaje de actina se produzca de una manera direccional. El factor hemaglutinante manosaresistente asociado a la célula (HAF), identificado en la cepa EIEC del serotipo O124:H-, podría mediar la adherencia de EIEC a las células epiteliales humanas¹⁴².

Identificación y caracterización de factores de virulencia



Las cepas EIEC se caracterizan por tener propiedades bioquímicas muy similares a las de *Shigella*. La no fermentación de lactosa, la movilidad negativa y la actividad descarboxilasa negativa, dificultan su identificación y diferenciación a partir del cultivo de especímenes clínicos. Las posibles causas de esta dificultad residen en la variabilidad y heterogeneidad de las propiedades fenotípicas de estas cepas, en la falta de un método de rutina para su detección y en la necesidad de utilizar métodos moleculares, además del seroagrupamiento, para poder definir a esta categoría¹²⁷. Anteriormente se recomendaba realizar el primocultivo en agar MacConkey, identificar colonias no fermentadoras o fermentadoras lentas de la lactosa, probar la actividad de lisina descarboxilasa y la movilidad, realizar el seroagrupamiento con antisueros polivalentes y monovalentes anti-O de los tipos más frecuentes de EIECy por último aplicar el test de Séreny, con el cual se verifica la propiedad de invasividad¹²³. Posteriormente, se incorporaron técnicas como el ELISA⁹³, para detectar proteínas involucradas en el proceso de invasión y sondas genéticas o cebadores específicos para la detección del plásmido Ipa. En la actualidad se recomienda como técnica de tamizaje la utilización de métodos moleculares como la PCR con el objeto de amplificar un fragmento del locus *ial*, como así también un fragmento de IpaH. Las secuencias IpaH constituyen múltiples copias que se encuentran en el cromosoma bacteriano y en el plásmido Ipa¹²⁴. En caso de obtenerse un resultado positivo por los métodos de amplificación, se deberá aislar la colonia positiva y aplicar un número mayor de pruebas bioquímicas para poder diferenciarla de *Shigella*¹¹⁰. Aquellos laboratorios que no realizan la técnica de PCR, deben utilizar pruebas bioquímicas como tamizaje para seleccionar las colonias de *E. coli* presuntivas



de EIEC, pero además no omitir la serología y las pruebas diferenciales con *Shigella* (producción de indol, lisina descarboxilasa, fermentación de mucato, utilización de acetato y β -galactosidasa).

Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento

Debe realizarse el tratamiento de sostén mediante la adecuada reposición de líquidos ante la presencia de deshidratación. La educación para la salud, especialmente referida a la higiene personal y la higiene de los alimentos, es uno de los pilares fundamental para evitar la infección, así como también garantizar el saneamiento básico mediante la provisión de agua segura y la eliminación sanitaria de excretas.

El tratamiento específico con antibióticos está indicado únicamente en los casos de diarrea grave. La selección del antibiótico a utilizar se realizará según el perfil de sensibilidad de *E. coli* en el área. En base a la similitud antigénica, bioquímica y expresión clínica con *Shigella* spp., es factible que la terapia antibiótica empleada para esta última, sea también útil para EIEC¹⁰⁸.

***Escherichia coli* enteroagregativo (EAEC)**

Escherichia coli enteroagregativo (EAEC) ha sido identificado en niños y adultos en países desarrollados y en vías de desarrollo, como así también en turistas que han visitado países en desarrollo. Además de las complicaciones



de la diarrea aguda, como deshidratación y muerte, EAEC puede causar diarrea persistente.

Hábitat y epidemiología

Las cepas EAEC han sido identificadas en todas las regiones del mundo donde se han estudiado. Los niños y adultos que viven en países en desarrollo, así como los viajeros que regresan desde esos países son susceptibles a la infección por EAEC^{1,116}. EAEC también puede producir una infección asintomática persistente en adultos y niños¹¹³. En América Latina, las cepas EAEC, son aislamientos bacterianos comunes en niños con diarrea y han sido identificadas en Colombia⁴², México²³, Guatemala⁷¹, Brasil¹¹⁶, Chile⁷⁰, Perú⁹², Argentina¹¹¹, Ecuador¹³ y Jamaica¹.

Esta categoría se puede identificar entre el 19% y 33% de los casos de diarrea del viajero, en función de la región del mundo visitada⁵⁶. En América Latina, la proporción de casos de diarrea del viajero asociados a EAEC se encuentra en el 25% de los viajeros, que es significativamente superior a las tasas observadas en los viajeros que visitan África, donde la proporción es de menos del 2% y el sur de Asia (15%)¹²⁵.

En esta categoría están descritos al menos 90 serotipos¹⁴⁸. Mientras que O44, O86 y O126 son predominantes en EAEC, otros, como O128 y O111, también se identificaron en aislamientos de EPEC, STEC y ETEC¹²². Algunas cepas resultaron no ser móviles o no tipificables por antígeno H¹⁴⁸.



Aunque algunas cepas EAEC atípicas han sido identificadas en terneros, lechones y caballos, los animales no han sido implicados como reservorio de este patógeno¹⁴⁶. Los alimentos contaminados parecen ser la principal fuente de infección y EAEC ha sido asociada a brotes de diarrea relacionados con alimentos en numerosas partes del mundo^{54, 128}.

Impacto clínico

El conocimiento sobre la patogénesis de EAEC es menor en comparación con las otras cuatro categorías de *E. coli* diarreigénico. La localización de la infección en el tracto gastrointestinal no está bien definida. Los estudios realizados sobre muestras obtenidas por endoscopia intestinal muestran que EAEC se puede localizar en yeyuno, íleon y epitelio del colon⁸⁵. Entre diferentes cepas EAEC estudiadas, la afinidad por los distintos segmentos del tracto intestinal fue heterogénea⁵².

Además de las complicaciones agudas de la diarrea como la deshidratación, EAEC también puede causar diarreas persistentes que pueden dar lugar a desnutrición y retraso del crecimiento. Las cepas de EAEC también han sido asociadas a diarrea crónica en pacientes infectados por VIH¹¹³.

Factores de virulencia

Se han sugerido tres características principales en la patogénesis de EAEC: 1) adherencia a la mucosa intestinal, 2) elaboración de enterotoxinas y citotoxinas y 3) inducción de la inflamación de la mucosa intestinal.



Un rasgo común que define a las cepas EAEC es la capacidad de adherirse con una apariencia de "pared de ladrillos apilados" en cultivos de células epiteliales HEP-2⁸⁶. Este fenotipo se debe a la capacidad de EAEC para unirse a otras EAEC, a las células epiteliales y a la superficie de las placas de cultivo de tejidos. A nivel molecular, los factores del fenotipo agregativo, también conocido como fenotipo AA, están contenidos en un plásmido de gran tamaño (pAA). Este plásmido porta un número de genes de virulencia que están bajo el control del gen *aggR*, regulador de la expresión de la fimbria I, involucrada en la adherencia agregativa.

Poco después de la descripción inicial de EAEC⁸², se desarrolló una sonda genética derivada del plásmido CVD432 o pAA⁵. La cepa prototipo EAEC 042, originalmente identificada en un niño con diarrea en Perú, produjo diarrea en la mayoría de los voluntarios inoculados con 10⁹ UFC. Esta cepa 042 (serotipo O44:H18) se usó también como cepa prototipo para el estudio de factores de virulencia⁸⁴ y de su genoma¹⁷. Las cepas EAEC, que hibridaban con la sonda AA, estaban asociadas con diarrea persistente. Sin embargo, se observó que no todas las cepas EAEC que causaban diarrea hibridaban con los oligonucleótidos específicos para *aggR*. Esto llevó a clasificar a esta categoría en EAEC "típico" cuando *aggR* estaba presente y EAEC "atípico" cuando *aggR* estaba ausente⁴⁸.

Numerosos autores han demostrado que el patrón AA se asocia con la presencia de adhesinas fimbriales y afimbriales. Sin embargo, los genes que codifican estas adhesinas se encuentran en baja prevalencia, lo que indica una alta diversidad de estructuras adhesivas responsables del patrón AA^{7, 12}. En cepas EAEC de diferentes serotipos se han descrito adhesinas afimbriales, o



proteínas de membrana externa (OMP) asociadas al patrón AA^{16, 79}. Sólo unas pocas fimbrias de EAEC han sido caracterizadas genéticamente. Las más estudiadas son las fimbrias de adherencia agregativa (AAF) I, II, y III que están codificadas en plásmidos de alto peso molecular. AAF/I es responsable del patrón AA en células HEp-2 y de la actividad de hemaglutinación manosaresistente de eritrocitos humanos. AAF/II se describió en la cepa prototipo 042 como la adhesina responsable del patrón AA en células HEp-2 y en células de mucosa del colon humano, así como de la formación de *biofilms* en cultivos de tejidos y sobre poliestireno. AAF/III también está involucrada en la agregación bacteriana y en el patrón AA en cultivos de células epiteliales^{7, 25, 83}. Un gran número de cepas EAEC carecen de los genes que codifican para las fimbrias, lo que indicaría que podrían expresar adhesinas que aún no han sido totalmente caracterizadas^{29, 101}.

Otra característica de las cepas EAEC es la capacidad para formar *biofilms* en las superficies bióticas y abióticas *in vitro*. La adherencia de EAEC a tejidos intestinales se caracteriza por formar un *biofilm* compuesto por agregados de bacterias en asociación con una capa de moco espeso. Esta característica del *biofilm* ha sido asociada con la persistencia de diarrea en los casos de infección por EAEC^{52, 85, 145}.

EAEC se considera un patógeno no invasivo. Sin embargo, algunos autores han demostrado el fenotipo invasivo en cultivos celulares¹⁰¹. Cepas EAEC fueron internalizadas por células HeLa, mediante componentes del citoesqueleto celular. Estas observaciones, conjuntamente con la descripción de casos en niños con diarrea sanguinolenta por EAEC sugieren que la capacidad de invasión puede ser otra característica de virulencia²³.



Las cepas EAEC producen efectos citotóxicos como vesiculación de las microvellosidades, apertura ampliada de las criptas y el aumento de la extrusión celular del epitelio⁴⁸. Numerosos factores de virulencia posibles han sido asociados a estos efectos citotóxicos como: las toxinas Pet y EAST-1 codificadas por plásmidos^{32, 114}, la toxina ShET1 codificada en el cromosoma³⁴, la proteína HlyE⁸⁰, la proteína implicada en la colonización (Pic), una mucinasa ampliamente asociada con *E. coli* y *Shigella* spp.⁵⁰ y un sistema de secreción tipo VI²⁸.

El papel de los genes de virulencia posibles y los resultados clínicos no están bien definidos. Sin embargo, la presencia de varios factores de virulencia se correlacionan con concentraciones elevadas de citocinas y marcadores inflamatorios en la materia fecal de adultos y de niños con diarrea, incluyendo IL-1a, IL-1β, IL-8, interferón γ, lactoferrina, leucocitos fecales y sangre oculta⁵³. La IL-8 es una importante quimiocina proinflamatoria involucrada en la patogénesis de EAEC. Es la responsable del reclutamiento de neutrófilos en la mucosa epitelial y del aumento de la secreción de fluidos intestinales⁶⁶. Curiosamente, los niveles de IL-8 son más altos en las heces de pacientes infectados con cepas positivas para *aggR* o *aafA* en comparación con las personas infectadas con cepas negativas para estos factores.

Identificación y caracterización de factores de virulencia

Los métodos utilizados para identificar EAEC involucran pruebas *in vitro* de adhesión celular o pruebas basadas en ADN dirigidas a genes que codifican para el proceso de adherencia agregativa. Como las cepas EAEC son



heterogéneas^{117, 131} y las secuencias de ADN no están presentes en todas las cepas EAEC, el ensayo de adherencia en células HEp-2 es aún el mejor método para definir esta categoría¹⁴⁰. Esta técnica, sin embargo, es muy laboriosa, especialmente para la detección de múltiples colonias procedentes de un gran número de muestras clínicas. Por otra parte, la mala interpretación de los patrones de adherencia puede resultar en la identificación errónea de EAEC. En la actualidad la PCR es utilizada como técnica de elección para identificar los genes que codifican para los factores de virulencia de EAEC como el plásmido pCVD432, *aggR*, *pic*, etc.^{97, 140}.

Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento

Al igual que con todos los demás enteropatógenos que causan diarrea aguda en niños, el apoyo principal para el tratamiento de la infección por EAEC es la rehidratación, preferiblemente la rehidratación oral, seguida por la incorporación de los alimentos según su tolerancia. La decisión de usar terapia con antibióticos debe hacerse sobre una base individual. Para la selección del antibiótico debe tenerse en cuenta la edad de la persona, la región del mundo donde la infección fue adquirida y los patrones locales de sensibilidad a los antimicrobianos.

En general, los viajeros procedentes de países desarrollados, que visitan países en desarrollo deben recordar los principios básicos de higiene: evitar el agua de grifo para beber, reemplazarla por agua embotellada y cocinar correctamente los alimentos. Hay que tener en cuenta que incluso los



alimentos cocinados, servidos en restaurantes, pueden llegar a contaminarse debido a condiciones antihigiénicas en su manipuleo.

La mayoría de las cepas son sensibles a las fluoroquinolonas, a la azitromicina y a la rifaximina. Sin embargo, la prevalencia de resistencia antibiótica es alta en cepas EAEC aisladas de niños de países en desarrollo⁴⁷.

***Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC)**

Desde hace más de dos décadas, *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC) es considerado un patógeno emergente transmitido por alimentos, asociado a casos esporádicos y brotes de diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH)^{44, 133}.

Fue descrito por primera vez en 1977 por Konowalchuk *et al.*⁶⁵, quienes demostraron que cepas de *E. coli* de los serogrupos O18, O26, O111 y O128, aisladas de niños con diarrea y de cerdos con edema de pulmón, producían una toxina a la que se denominó Verotoxina, debido al efecto citotóxico en células Vero. Pocos años después se aislaron cepas de *E. coli* que producían un efecto citotóxico en células HeLa, el cual podía ser neutralizado por un antisuero anti-toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1⁹⁰, por lo cual se la llamó *Shiga-like toxin*. En 1982, se produjeron dos brotes de colitis hemorrágica en Michigan y Oregon, EE.UU., causados por el consumo de hamburguesas, identificándose por primera vez el serotipo de *E. coli* O157:H7 como patógeno humano¹⁰⁵.



Escherichia coli O157:H7 es el prototipo de más de 150 serotipos que comparten el mismo potencial patogénico. Las cepas STEC asociadas a enfermedades severas en el hombre pertenecen a la categoría de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)¹⁵³. Por otra parte, es el serotipo aislado más frecuentemente y al que se le atribuye la ocurrencia de la mayoría de los grandes brotes^{4, 72, 150}.

Hábitat y epidemiología

Los sistemas de vigilancia varían enormemente entre países, por lo tanto las comparaciones de la incidencia de las enfermedades asociadas a STEC deben realizarse cuidadosamente. En la Tabla 1 se presentan las incidencias comparativas en EE.UU., Canadá, algunos países europeos, Australia y Nueva Zelanda.

En América Latina, las infecciones por STEC son endémicas y contribuyen a la carga del síndrome diarreico agudo en niños menores de 5 años de edad. Además, son responsables del 2% del total de casos de diarrea aguda, y en algunos estudios del 20 al 30% de las diarreas con sangre⁴⁶. El SUH es endémico en algunos países de la región del Cono Sur y la notificación sólo es obligatoria en la Argentina, Bolivia, Chile y Paraguay.

En la Argentina, las enfermedades asociadas a STEC representan un grave problema de Salud Pública. La vigilancia se realiza mediante tres estrategias: (1) notificación de casos de SUH al Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS-Módulo C2), la cual es obligatoria, inmediata e



individualizada (Resolución N° 346/00), (2) vigilancia centinela en 25 unidades localizadas en 16 provincias y (3) vigilancia basada en laboratorios (SNVS-Módulo SIVILA). La vigilancia molecular se realiza a través de la PulseNet de América Latina y el Caribe.

El SUH posentérico (SUH D+), endémico en nuestro país, es la primera causa de insuficiencia renal aguda en niños y la segunda de insuficiencia renal crónica. En la última década, se reportaron anualmente unos 400 casos. La incidencia varió de 10 a 17 casos por 100.000 niños menores de 5 años de edad, y la letalidad del 1 al 5% (Figura 1).

Tabla 1. Incidencia anual de las enfermedades asociadas a *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en diferentes países del mundo.

País	Incidencia/100.000 habitantes
EE.UU. ^a	1,10 (no-O157) / 0,97 (O157)
Canadá ^b	2,3
Europa ^c	0,96
Irlanda	4,4
Suecia	3,6
Dinamarca	3,2
Holanda	2,9
Gran Bretaña	1,8
Alemania	1,2
Australia ^d	0,4
Nueva Zelanda ^d	3,3

^aCenters for Disease Control and Prevention. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2011 (Final Report). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. 2012. <http://www.cdc.gov/national-surveillance/case-surveillance.html>. Accessed April 17, 2013.

^bGovernment of Canada. Canadian National Enteric Pathogen Surveillance System (C Enter Net). 2011 Short Report. Guelph, ON: Public Health Agency of Canada. <http://www.phac-aspc.gc.ca/c-enteric/publications-eng.php#a2>. Accessed April 17, 2013.

^cEuropean Centre for Disease Prevention and Control. 2012. Annual epidemiological report. Reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data. ECDC, Stockholm, Sweden. <http://ecdc.europa.eu/en/Publications/Annual-Epidemiological-Report-2012.pdf>. Accessed April 17, 2013.

^dVally H, Hall G, Dyda A, Raupach J, Knope K, Combs B, Desmarchelier P. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Australia, 2000-2010. BMC Public Health; 2012;12:63-74.



El SUH no sólo se observa en niños, sino también en adolescentes y en personas ancianas. Se considera como factor desencadenante de enfermedad por STEC a la falta de inmunidad en los niños y la disminución o pérdida de la misma en las personas adultas. Si bien la infección por STEC puede afectar a niños de ambos sexos, se demostró que las niñas son más propensas a enfermar que los niños¹⁰⁹.

La infección por STEC muestra una variación estacional, con aumento de casos en primavera y verano, épocas que coinciden con el período en que aumenta la portación de STEC en el ganado bovino.

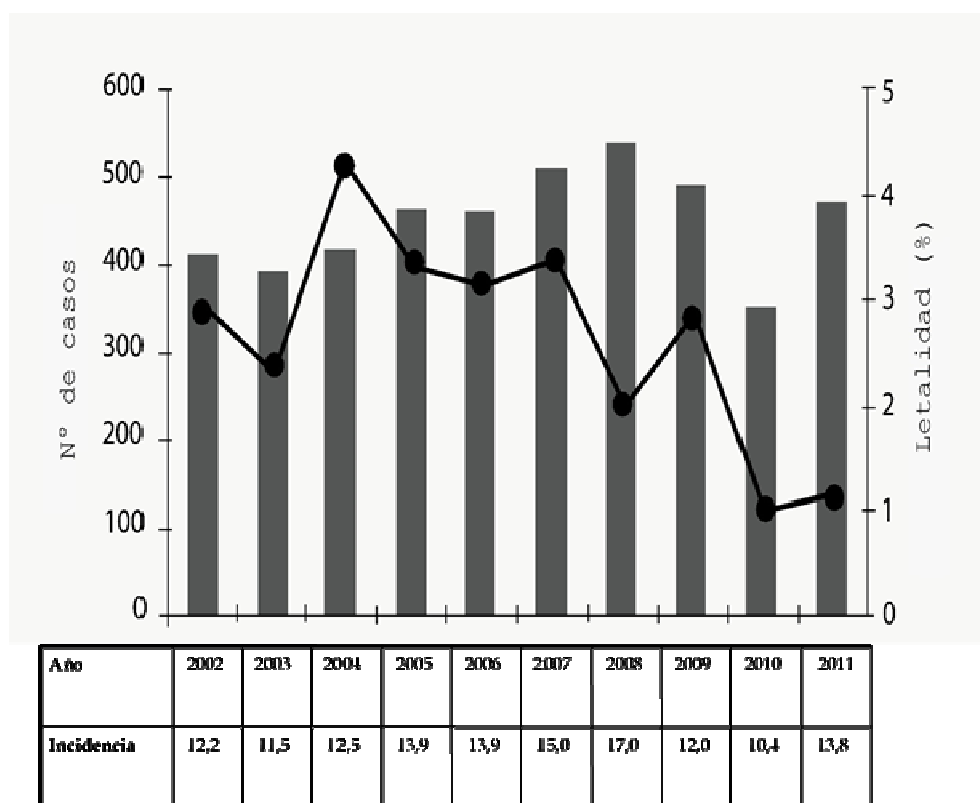


Figura 1. Número de casos con síndrome urémico hemolítico, tasa de incidencia y letalidad durante el período 2002-2011.

En las últimas décadas, surgió un nuevo escenario de riesgo debido a la evolución bacteriana que permitió la emergencia de un clon hipervirulento de O157 descrito después del brote asociado al consumo de espinacas en EE.UU. en el 2006⁷². Dicho clon está distribuido en todo el mundo, incluida la Argentina⁷⁷. Por otra parte, en el año 2011, un brote masivo de diarrea y SUH ocurrió en Alemania y otros 13 países europeos, EE.UU. y Canadá, asociado al consumo de brotes de fenogreco en ensaladas. La caracterización de la cepa O104:H4 causal reveló una inusual combinación de factores de virulencia típicos de *E. coli* enteroagregativo y la capacidad de producir Stx lo que le otorgó una gran capacidad patogénica¹¹⁸.

Los rumiantes en general, y el ganado vacuno en particular, se describieron como los principales reservorios de STEC. En distintos países, entre los que se incluye a la Argentina, se realizaron numerosos estudios sobre la prevalencia de STEC que permitieron confirmar el rol del ganado vacuno como principal reservorio^{19, 73, 76, 95}. En un importante muestreo realizado en nueve frigoríficos exportadores de Argentina se encontró una prevalencia de STEC O157 del 4,1% en materia fecal y del 2,6% en carcasas bovinas. Para STEC no-O157 la prevalencia fue del 22,3% en materia fecal y del 9,0% en carcasas^{73, 74}. Si bien cerdos, aves, perros y gatos no son reservorios importantes de STEC⁸, se demostró que la interacción entre mascotas y niños es un factor de riesgo para el contagio⁶. La principal vía de transmisión de STEC O157 y no-O157 son los alimentos contaminados, como por ejemplo, carne molida, productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, hamburguesas, embutidos fermentados, morcilla, leche no pasteurizada, yogur, quesos, mayonesa, papas, lechuga, brotes de soja y alfalfa, jugos de manzana



no pasteurizados y agua, entre otros⁴⁵. Otras formas de transmisión incluyen el contacto directo del hombre con los animales, la contaminación cruzada durante la preparación de los alimentos, la transmisión persona a persona por la ruta fecal-oral, y la contaminación fecal de aguas de recreación o aguas de pozo. Diversos trabajos han descrito que la excreción de STEC O157 en humanos es prolongada e intermitente¹³². En niños pequeños, a diferencia de lo que ocurre en niños mayores y adultos, el tiempo de excreción de O157 supera ampliamente el tiempo de resolución de los síntomas. Toda persona con infección por STEC, sintomática o asintomática, no deberá obtener el alta médica hasta no tener dos coprocultivos negativos sucesivos con intervalos de 48 h entre ellos. Es importante destacar que la dosis infectiva de este grupo bacteriano para ocasionar enfermedad es de 10 a 100 bacterias por gramo de alimento.

Impacto clínico

En las infecciones por STEC, el período de incubación promedio es de 3 días (con un rango de 1-8 días). El cuadro clínico incluye un período de 1 a 2 días de vómitos, fiebre baja o ausente, dolores abdominales severos, diarrea sin sangre y evidencia de edema de la mucosa colónica como síntomas iniciales, seguidos por diarrea sanguinolenta o colitis hemorrágica durante 4 a 6 días. Aunque en la mayoría de los casos, la diarrea por STEC es autolimitada, aproximadamente del 5 al 10% de los niños infectados evolucionan a SUH, para el cual no existe un tratamiento específico, sino de sostén.



Entre los factores predictivos de evolución a SUH se incluyen: edades extremas, leucocitosis, tratamiento con agentes reductores de movilidad intestinal o antidiarreicos, fiebre, período prodrómico corto y, en algunos casos, diarrea sanguinolenta. El genotipo de la toxina de la cepa virulenta también influye en la evolución a SUH. Estudios poblacionales sugieren que aproximadamente el 90% de los casos de SUH están precedidos por diarrea. Los niños constituyen el grupo más vulnerable, con una mayor incidencia de infecciones sintomáticas por STEC y riesgo alto de evolución a SUH⁷⁵.

El SUH, descrito por primera vez por Gasser et al. en 1955³⁷, es una enfermedad de comienzo agudo con anemia hemolítica microangiopática, plaquetopenia y daño renal, que habitualmente puede seguir o no a un episodio de diarrea con o sin sangre, en un niño previamente sano. Las manifestaciones comunes son: palidez, petequias, hematomas, oliguria, edema, hipertensión arterial y cambios neurológicos como letargia o convulsiones²² (Comité de Nefrología, 1995). Los criterios de laboratorio para el diagnóstico de SUH son: (1) hemoglobina menor de 10 mg/dl o hematocrito menor de 30% o caída de al menos 5 puntos, con cambios microangiopáticos en el frotis de sangre periférica (esquistocitos, células en casco o fragmentadas), (2) daño renal agudo evidenciado por hematuria, proteinuria, uremia mayor de 50 mg/dl en ausencia de deshidratación o creatinina mayor de dos desviaciones estándar respecto a edad y sexo o aumento del 50% de los valores al inicio de la enfermedad y (3) recuento de plaquetas menor de 150.000/mm³. Aproximadamente la mitad de los pacientes con SUH requiere diálisis y el 75% requiere transfusión sanguínea.



En los últimos años, el diagnóstico precoz de la enfermedad y el mejor manejo de la insuficiencia renal aguda y de la anemia, disminuyó la letalidad durante el período agudo. En la actualidad es del 3 al 5%. Sin embargo, un 5% de niños con SUH desarrolla insuficiencia renal crónica y en pocos años requiere procedimientos dialíticos o trasplante renal. Otro 20% continúa con microhematuria y grados variables de proteinuria y puede desarrollar insuficiencia renal crónica terminal en lapsos variables que pueden llegar a décadas^{60,130}. Esta patología implica grandes costos económicos para los sistemas de salud, lo cual tiene un impacto importante en los países en desarrollo.

Factores de virulencia

Las toxinas Shiga (Stx) son el principal factor de virulencia de STEC¹⁵. Poseen estructura de subunidades A-B, y están codificadas por bacteriófagos insertados en el cromosoma bacteriano. La subunidad A (33 KDa) es la parte biológicamente activa y la B (7,5 KDa), presente en cinco copias, es la que se une al receptor celular específico globotriaosilceramida (Gb3). Se clasifican en dos tipos, Stx1 y Stx2.

Las cepas STEC de origen humano, animal o de alimentos pueden producir Stx1, Stx2 o variantes, solas o en combinación de dos o más toxinas. Se han descrito los siguientes subtipos o variantes de toxina: Stx1a (*stx*_{1a}),



Stx1c (*stx_{1c}*), Stx1d (*stx_{1d}*), Stx2a (*stx_{2a}*), Stx2b (*stx_{2b}*), Stx2c (*stx_{2c}*), Stx2d (*stx_{2d}*), Stx2e (*stx_{2e}*), Stx2f (*stx_{2f}*) y Stx2g (*stx_{2g}*)¹¹⁹. Los miembros de la familia de Stx presentan grandes diferencias en su toxicidad en tejidos celulares y en animales. Stx2 tiene una actividad citotóxica de 100 a 1.000 veces superior a Stx1. Se ha demostrado que cepas STEC Stx2c son menos virulentas y causan diarrea sanguinolenta menos frecuentemente que cepas Stx2 o Stx2/Stx2c. Otros estudios sugieren que individuos infectados con cepas Stx2 presentan mayor riesgo de desarrollar SUH (89). Por lo tanto, la prevalencia de cepas STEC de determinados genotipos *stx*, junto a otros factores de riesgo de evolución a SUH, podrían explicar la alta incidencia de enfermedad humana y la severidad de los casos clínicos que se presentan en ciertas regiones.

El plásmido pO157 de 90 Kb, se encuentra en la mayoría de las cepas de STEC O157:H7 y contiene diversos genes que codifican para los siguientes factores de virulencia: *espP* (serina proteasa extracelular), *katP* (catalasa-peroxidasa), *hlyA* (enterohemolisina), *etp* (sistema de secreción tipo II), y para una fimbria que podría estar involucrada en la etapa inicial de colonización de los enterocitos¹²⁰. Algunos factores de adherencia intestinal están codificados en el *locus* LEE del cromosoma. Al igual que en EPEC, el gen *eae* codifica la proteína íntima responsable de la unión íntima de la bacteria al enterocito y de la desorganización de las microvellosidades con producción de la lesión AE. Sin embargo, la presencia de la región LEE no sería esencial para la patogénesis, dado que un gran número de cepas STEC-LEE negativas son capaces de causar enfermedad severa y ocasionalmente brotes^{62, 99}. Otros factores de adherencia están codificados fuera de la región LEE como las adhesinas *Iha* (del inglés, *iron regulated gene A homologue adhesin*)¹³⁴, *Efa1*



(del inglés, *EHEC factor for adherence*)⁸⁸, LPFO157/OI-141, LPFO157/OI-154 y LPFO113/OI-154 (del inglés, *long polar fimbria*)^{27, 141}. Otras tres adhesinas, ToxB (proteína identificada en pO157)¹³⁵, Saa (del inglés, *STEC autoagglutinating adhesin*) identificada en cepas LEE negativas¹⁰⁰, y Sfp (del inglés, *sorbitol fermenting plasmid*)⁵⁵, están codificadas en el megaplásmido de cepas STEC.

En 2003, Karmali et al.⁶¹ propusieron una clasificación para los serotipos de STEC en 5 seropatotipos (A-E), de acuerdo a su potencial patogénico y epidémico. El seropatotipo A (O157: H7 y O157: NM) es considerado como el más virulento asociado con una mayor incidencia en enfermedad humana severa y con una alta frecuencia en brotes. El seropatotipo B (O26:H11/NM; O45:H2/NM; O103:H2/H11/H25/MN; O111:H8/NM; O121:H7/H19; y O145:NM) se asocia con enfermedad humana grave, pero con una frecuencia más baja, y es poco común en brotes. Los seropatotipos C (O91:H21, O104:H21 y O113:H21, entre otros) y D tienen una baja incidencia en enfermedad humana y rara vez se asocian a brotes. Por último, el seropatotipo E se compone de muchos serotipos que se encuentran en el reservorio animal y en los alimentos, pero que hasta el presente no han sido implicados en enfermedad humana.

Las cepas de STEC alcanzan el intestino y se adhieren a los enterocitos sin invadirlos. Esta reducción de la superficie absortiva causa una diarrea sin sangre. La toxina Shiga liberada se une, mediante el pentámero B, a la célula epitelial del intestino por interacción con el receptor Gb3 que se encuentra en la membrana apical. La toxina es luego internalizada en una vesícula endocítica, y transportada al aparato de Golgi, donde la subunidad A es clivada proteolíticamente liberando el fragmento A1, el cual actúa sobre la subunidad



ribosomal 60S, inhibiendo la síntesis proteica y provocando la muerte celular. La toxina puede también ser translocada desde la membrana apical a la superficie basolateral, con inducción de IL-8, que contribuye a la acumulación de leucocitos en la pared intestinal. Se produce un daño en las células endoteliales de los vasos sanguíneos provocando diarrea sanguinolenta. Stx entra a la circulación sanguínea y es transportada a distintos órganos blanco, cuyas células endoteliales poseen el receptor Gb3. El LPS bacteriano y las citoquinas del hospedador aumentan la sensibilidad a las Stx incrementando la disponibilidad de dichos receptores. En el riñón se encuentran altos niveles de Gb3, particularmente en la región cortical, donde se observan las principales lesiones en los pacientes con SUH. Las lesiones histopatológicas ocurren por interacción de la Stx con las células endoteliales de los vasos sanguíneos: éstas se hinchan y se desprenden a nivel del glomérulo. Simultáneamente se produce un depósito de fibrina y de plaquetas en la microvasculatura renal, se oclucionan los capilares y se reduce el flujo sanguíneo, provocando insuficiencia renal y ruptura de los glóbulos rojos. También se observan lesiones trombóticas, particularmente en la microvasculatura del intestino, cerebro y páncreas.

En la Argentina, *E. coli* O157:H7 es el principal serotipo (> 70% de los casos), seguido de O145:NM. Entre las cepas STEC O157, el genotipo prevalente es *stx₂/stx_{2c}/eae/ehxA* (> 80%) y entre las cepas STEC no-O157 *stx₂/eae/ehxA* (>70%).

Identificación y caracterización de factores de virulencia



La mayoría de las cepas STEC O157 no fermentan el sorbitol y no tienen actividad de β -glucuronidasa y en placas de agar MacConkey Sorbitol (SMAC) desarrollan colonias pequeñas, incoloras y translúcidas. En cambio, los serotipos no-O157 fermentan el sorbitol y poseen actividad de β -glucuronidasa por lo que desarrollan colonias pequeñas y rosadas en ese medio.

Se pueden aplicar métodos inmunocromatográficos comerciales para la detección rápida de STEC O157 y no-O157 a partir del medio de enriquecimiento.

El diagnóstico presuntivo de *E. coli* O157 de colonias sospechosas en SMAC se puede realizar por seroagrupamiento por aglutinación en lámina con antisuero anti-O157 o con reactivo de látex. La metodología de PCR múltiple se utiliza como técnica de tamizaje para detectar los genes *stx*₁, *stx*₂ y *rfb*_{O157}. PCR accesorias se utilizan para detectar otros genes de virulencia, como el gen *eae*, *ehxA*, *saa*, *fliC*_{H7}, entre otros. Esto permite la caracterización molecular de la cepa.

La sensibilidad del procedimiento de aislamiento de *E. coli* O157:H7/NM puede aumentarse aplicando la técnica de separación inmunomagnética (SIM).

Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento

Hasta el presente no existe una terapia específica para las infecciones por STEC. Si bien, *E. coli* O157 es sensible a la mayoría de los agentes antimicrobianos comúnmente utilizados, aún no se confirmó que la antibioticoterapia aporte algún beneficio para el paciente. Por otra parte, algunos autores demostraron que dicho tratamiento puede precipitar la



evolución a SUH. Por ejemplo, trimetoprima-sulfametoxazol estimula la liberación de Stx *in vitro*. Tampoco se deben usar agentes antidiarreicos, que disminuyen la movilidad intestinal, pues estudios retrospectivos señalan un riesgo aumentado de evolución a SUH. En el período agudo del SUH, el tratamiento está basado en el control de las alteraciones fisiopatológicas, como la restricción de agua y sal, las transfusiones de sedimento globular, la diálisis peritoneal y el adecuado aporte calórico-proteico. Actualmente se hallan en etapa de desarrollo la producción de vacunas para prevenir la infección por STEC.

Las principales medidas para controlar la transmisión de STEC y prevenir la infección son:

a) Aplicar buenas prácticas de manufacturay de higiene y establecer puntos críticos de control durante toda la cadena de producción del alimento.

b) Asegurar una correcta y homogénea cocción de la carne. La bacteria se destruye a 68,3°C.

c) Utilizar distintos utensilios de cocina para trozar la carne cruda y para alimentos cocidos, evitando así la contaminación cruzada.

d) Controlar el uso de leche y derivados lácteos correctamente pasteurizados y conservar la cadena de frío.

e) Consumir jugos de frutas pasteurizados.

f) Lavar cuidadosamente las frutas y verduras.

g) Asegurar la correcta higiene de las manos y utensilios de cocina.

h) Lavar las manos con agua y jabón luego de ir al baño y luego del contacto con animales en granjas educativas, zoológicos y mascotas.



- i) Evitar el hacinamiento en instituciones cerradas (jardines maternos, jardines de infantes, escuelas, geriátricos, cárceles, etc.).
- j) Evitar la concurrencia de personas con diagnóstico bacteriológico positivo de STEC a instituciones cerradas.
- k) Evitar el uso de antimicrobianos y antidiarreicos.
- l) Educar a médicos, microbiólogos, personal de plantas elaboradoras de alimentos y restaurantes, de jardines maternos, de infantes y geriátricos y a la comunidad en general, sobre los riesgos que implica la infección por STEC.
- m) Consumir agua potable.
- n) Utilizar aguas recreacionales habilitadas.
- ñ) Fomentar campañas de educación y prevención en jardines maternos, jardines de infantes, escuelas primarias, secundarias y en establecimientos donde se expongan animales.

Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* diarreigénico

El algoritmo para el procesamiento de materia fecal se presenta en la Figura 2 (pág 72).

Se recomienda: a) recolectar la materia fecal lo antes posible después del establecimiento de la diarrea; b) el paciente no debe estar con tratamiento antibiótico; c) recolectar la muestra después de suspender la antibioticoterapia por no menos de 48 h.



Si la recolección de la materia fecal es por evacuación espontánea, se deben tomar y colocar con espátula 2 g de materia fecal en un recipiente estéril. La muestra debe permanecer refrigerada a 4°C hasta su procesamiento. Si la muestra no es procesada dentro de las 2 h de recolectada, deberá ser colocada, utilizando un hisopo estéril en un medio de transporte (Cary-Blair, Stuart, Amies o solución salina tamponada con glicerol). Si el procesamiento se efectúa dentro de los 2-3 días, el medio de transporte deberá ser conservado refrigerado a 4°C. Si el espécimen no es analizado en ese lapso de tiempo deberá mantenerse congelado a -70°C. Si se realiza un hisopado rectal, se debe tomar la muestra con hisopo, conservarlo en un medio de transporte y mantenerlo refrigerado hasta su procesamiento. Si el niño usa pañal, se debe tomar la muestra que queda en el mismo con hisopo o espátula.

El procedimiento para el aislamiento comienza con la siembra de la materia fecal en forma directa en placa de agar MacConkey (MAC) y paralelamente, para la identificación de STEC O157 y no-O157, se siembra la materia fecal en agar MacConkey con sorbitol (SMAC) en forma directa y luego del enriquecimiento en caldo triptéina de soja (CTS a 37°C por 6 h) y en CTS con el agregado de cefixima y telurito de potasio (a 37°C por 6 h). Luego de la incubación de las placas de agar MAC y SMAC a 37°C por 18 h se realiza la observación de la morfología y de las características fenotípicas (fermentación de la lactosa o del sorbitol) de las colonias aisladas.

A continuación se toma una muestra de la zona de crecimiento confluyente y de las colonias presuntivas (lactosa+ y lactosa-) y (sorbitol + y sorbitol-) de las placas MAC y SMAC respectivamente, para extracción de ADN y posterior realización de diferentes ensayos de PCR que se utilizan como



técnicas de tamizaje para la identificación de las categorías de *Escherichia coli* diarreigénico. En la Figura 2 se muestran dos PCR múltiples que utilizan oligonucleótidos específicos para detectar en la primera mPCR, el gen *eae* (EPEC y STEC) y los genes de *lt* y *st* (ETEC) y en la segunda mPCR, el gen *lpaH* (EIEC), el gen *aggR* (EAEC) y los genes *stx*₁, *stx*₂ (STEC). Por otra parte se muestra en el algoritmo de identificación de STEC O157 y no-O157, la aplicación de una mPCR para la detección de los genes de *stx*₁, *stx*₂ y *rfb*_{O157}.

Si se obtiene una señal positiva por PCR múltiple de la zona confluyente, se deberá identificar la colonia positiva correspondiente. Para tal fin se debe realizar una PCR de las colonias aisladas. A las colonias con señal positiva se les realiza la confirmación bioquímica de *E. coli*. Se debe tener en cuenta que si se detecta una colonia con señal positiva para el gen *lpaH*, se deben incorporar pruebas bioquímicas diferenciales de *Shigella* spp. A continuación se determina: a) el antígeno somático O con antisueros monovalentes, b) la movilidad y el antígeno flagelar H y c) la sensibilidad a los antimicrobianos de las cepas.

Bibliografía

1. Adachi JA, Jiang ZD, Mathewson JJ, Verenkar MP, Thompson S, Martinez-Sandoval F, Steffen R, Ericsson CD, DuPont HL. Enterohaggative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. Clin Infect Dis. 2001; 32: 1706-9.



2. Aranda KR, Fabbriotti SH, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. FEMS Microbiol Lett. 2007; 267: 145-50.
3. Araujo JM, Tabarelli GF, Aranda KR, Fabbriotti SH, Fagundes-Neto U, Mendes CM, Scaletsky IC. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. J Clin Microbiol. 2007; 45: 3396-9.
4. Barret TJ, Lior H, Green JH, Khakhria R, Wells JG, Bell BP, Greene KD, Lewis J, Griffin PM. Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. J Clin Microbiol. 1994; 32: 3013-7.
5. Baudry B, Savarino SJ, Vial P, Kaper JB, Levine MM. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. J Infect Dis. 1990; 16: 1249-51.
6. Bentancor A, Rumi MV, Carbonari C, Gerhardt E, Larzábal M, Vilte DA, Pistone-Creydt V, Chinen I, Ibarra C, Cataldi A, Mercado EC. Virulence profile of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats and genetic relationships with isolates from cattle, meat and humans. Vet Microbiol. 2012; 156: 336-42.
7. Bernier C, Gounon P, Le Bouguenec C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. Infect Immun. 2002; 70: 4302-11.
8. Beutin L, Geier D, Steinrück H, Zimmermann S, Scheutz F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. J Clin Microbiol. 1993; 31: 2483-8.
9. Beutin L, Gleier K, Kontny I, Echeverrias P, Scheutz F. Origin and characteristics of enteroinvasive strains of *Escherichia coli* (EIEC) isolated in Germany. Epidemiol Infect. 1997; 118: 199-205.



10. Blake PA, Ramos S, MacDonald KL, Rassi V, Gomes TA, Ivey C, Bean NH, Trabulsi LR. Pathogen-specific risk factors and protective factors for acute diarrheal disease in urban Brazilian infants. *J Infect Dis.* 1993; 167: 627-32.
11. Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Alonso MP, Mora A, Coira MA, Madrid C, Juárez A, Bernárdez MI, González EA, Blanco J. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Int Microbiol.* 2006; 9: 103-10.
12. Boisen N, Struve C, Scheutz F, Krogfelt KA, Nataro JP. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. *Infect Immun.* 2008; 76: 3281-92.
13. Bourgeois AL, Gardiner CH, Thornton SA, Batchelor RA, Burr DH, Escamilla J, Echeverria P, Blacklow NR, Herrmann JE, Hyams KC. Etiology of acute diarrhea among United States military personnel deployed to South America and West Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 1993; 48: 243-8.
14. Bray J. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bacterium coli neopolitenum* from summer diarrhoea of infants. *J Pathol Bacteriol.* 1945; 57: 239-47.
15. Calderwood SB, Acheson DWK, Keusch GT, Barrett TJ, Griffin PM, Strockbine NA. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News.* 1996; 62: 118-9.
16. Chart H, Smith HR, Rowe B. Enteroaggregative strains of *Escherichia coli* belonging to serotypes O126:H27 and O44:H18 express antigenically similar 18 kDa outer membrane-associated proteins. *FEMS Microbiol Lett.* 1995; 132: 17-22.
17. Chaudhuri RR, Sebaihia M, Hobman JL, Webber MA, Leyton DL, Goldberg MD, Cunningham AF, Scott-Tucker A, Ferguson PR, Thomas CM, Frankel G, Tang CM, Dudley EG, Roberts IS, Rasko DA, Pallen MJ, Parkhill J, Nataro JP, Thomson NR, Henderson IR. Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. *PLoS One.* 2010; 5: e8801.
18. Cheasty T, Rowe B. Antigenic relationships between the enteroinvasive *Escherichia coli* O antigens O28ac, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152 and O164 and *Shigella* O antigens. *J Clin Microbiol.* 1983; 17: 681-4.



19. Chinen I, Otero JL, Miliwebsky E, Roldán MI, Chillemi GM, Baschkier A, Chillemi GM, Nóboli C, Frizzo L, Rivas M. Characterization of Shiga-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from calves in Argentina. *Res Vet Sci*. 2003; 74: 283-6.
20. Chinen I, Terragno R, Baschkier A, Bruno S, Rivas M. Diagnóstico diferencial de cepas de *Escherichia coli* enteroinvasiva por pruebas bioquímicas y moleculares. Congreso Argentino de Microbiología, 2007, Resumen 20969. *Rev Argent Microbiol*. 2007; 39 Supl 1: 82.
21. Cleary J, Lai LC, Shaw RK, Straatman-Iwanowska A, Donnenberg MS, Frankel G, Knutton S. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology*. 2004; 150(Pt 3): 527-38.
22. Comité de Nefrología. Incidencia del síndrome urémico hemolítico(SUH) en la República Argentina. *Arch Arg Pediatr*. 1995; 93: 407-11.
23. Cravioto A, Tello A, Navarro A, Ruiz J, Villafán H, Uribe F, Eslava C. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet*. 1991; 337: 262-4.
24. Cravioto A, Tello A, Villafan H, Ruiz J, del Vedovo S, Neeser JR. Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. *J Infect Dis*. 1991; 163: 1247-55.
25. Czeczulin JR, Balepur S, Hicks S, Phillips A, Hall R, Kothary MH, Navarro-Garcia F, Nataro JP. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1997; 65: 4135-45.
26. Dean P, Muhlen S, Quitard S, Kenny B. The bacterial effectors EspG and EspG2 induce a destructive calpain activity that is kept in check by the co-delivered Tir effector. *Cell Microbiol*. 2010; 12: 1308-21.
27. Doughty S, Sloan J, Bennet-Wood V, Robertson M, Robins-Browen RM, Hartland EL. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of



- enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect Immun. 2002; 70: 6761-9.
28. Dudley EG, Abe C, Ghigo JM, Latour-Lambert P, Hormazabal JC, Nataro JP. An Inc11 plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. Infect Immun. 2006a; 74: 2102-14.
 29. Dudley EG, Thomson NR, Parkhill J, Morin NP, Nataro JP. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 2006b; 61: 1267-82.
 30. DuPont HL, Ericsson CD, Farthing MJ, Gorbach S, Pickering LK, Rombo L, Steffen R, Weinke T. Expert review of the evidence base for prevention of travelers' diarrhea. J Travel Med. 2009; 16: 149-60.
 31. Durno C, R. Soni R, Sherman P. Adherence of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O157:H7 to isolated epithelial cells and brush border membranes in vitro: role of type 1 fimbriae (pili) as a bacterial adhesin expressed by strain CL-49. Clin Invest Med. 1989; 12: 194-200.
 32. Eslava C, Navarro-Garcia F, Czeizulin JR, Henderson IR, Cravioto A, Nataro JP. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun. 1998; 66: 3155-63.
 33. Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition. Sao Paulo Med J. 2000; 118: 21-9.
 34. Fasano A, Noriega FR, Maneval DR Jr, Chanasongcram S, Russell R, Guandalini S, Levine MM. *Shigella* enterotoxin 1: an enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a active in rabbit small intestine *in vivo* and in vitro. J Clin Invest. 1995; 95: 2853-61.
 35. Faundez G, Figueroa G, Troncoso M, Cabello FB. Characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea in Chile. J Clin Microbiol. 1988; 26: 928-32.



36. Ferguson WW, June RC. Experiments on feeding adult volunteers with *Escherichia coli* 111, B4, a coliform organism associated with infant diarrhea. Am J Hyg. 1952; 55: 155-69.
37. Gasser C, Gautier E, Steck A, Siebenmann RE, Oechslin R. Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia. Schweiz Med Wochenschr. 1955; 85: 905-9.
38. Giannella RA. *E. coli* heat-stable enterotoxins; guanylin, and their receptors: what are they and what do they do? J Lab Clin Med. 1995; 125: 173-81.
39. Gill DM, Richardson SH. Adenosine diphosphate-ribosylation of adenylate cyclase catalyzed by heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*: comparison with cholera toxin. J Infect Dis. 1980; 141: 64-70.
40. Giron JA, HoAS, Schoolnik GK. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. Science. 1991; 254: 710-3.
41. Gomes TA, Irino K, Girão DM, Girão VB, Guth BE, Vaz TM, Moreira FC, Chinarelli SH, Vieira MA. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains?. Emerg Infect Dis. 2004; 10: 1851-5.
42. Gomez-Duarte OG, Arzuza O, Urbina D, Bai J, Guerra J, Montes O, Puello M, Mendoza K, Castro GY. Detection of *Escherichia coli* enteropathogens by multiplex polymerase chain reaction from children's diarrheal stools in two Caribbean-Colombian cities. Foodborne Pathog Dis. 2010; 7: 199-206.
43. Gordillo ME, Reeve GR, Pappas J, Mathewson JJ, DuPont HL, Murray BE. Molecular characterization of strains of enteroinvasive *Escherichia coli* O143, including isolates from a large outbreak in Houston, Texas. J Clin Microbiol. 1992; 30: 889-93.
44. Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol Rev. 1991; 13: 60-98.
45. Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. J Anim Sci. 2007; 85: E45-62.



46. Guth BEC, Prado V, Rivas M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. En:Torres AG, editor. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. Sharjah, United Arab Emirates, Bentham Science Publishers Ltd., 2010, p 65-83.
47. Haider K, Faruque SM, Shahid NS, Albert MJ, Nahar S, Malek A, Tzipori S, Alam AN. Enteraggative *Escherichia coli* infections in Bangladeshi children: clinical and microbiological features. J Diarrhoeal Dis Res. 1991; 9: 318-22.
48. Harrington SM, Dudley EG, Nataro JP. Pathogenesis of enteraggative *Escherichia coli* infection. FEMS Microbiol Lett. 2006; 254: 12-8.
49. Harris JR, Mariano J, Wells JG, Payne BS, Donnel HD, Cohen ML. Person-to-person transmission in an outbreak of enteroinvasive *Escherichia coli*. Am J Epidemiol. 1985; 122: 245-52.
50. Henderson IR, Czeczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteraggative *Escherichia coli*. Infect Immun. 1999; 67: 5587-96.
51. Hernandez RT, Elias WP, Vieira MA, Gomes TA. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. 2009; 297: 137-49.
52. Hicks S, Candy DC, Phillips AD. Adhesion of enteraggative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. Infect Immun. 1996; 64: 4751-60.
53. Huang DB, DuPont HL, Jiang ZD, Carlin L, Okhuysen PC. Interleukin-8 response in an intestinal HCT-8 cell line infected with enteraggative and enterotoxigenic *Escherichia coli*. Clin Diagn Lab Immunol. 2004; 11: 548-51.
54. Itoh Y, Nagano I, Kunishima M, Ezaki T. Laboratory investigation of enteraggative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. J Clin Microbiol. 1997; 35: 2546-50.
55. Jenkis C, Willshaw GA, Evans J, Cheasty T, Chart H, Shaw DJ, Dougan G, Frankel G, Smith HR. Subtyping of virulence genes in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) other than serogroup O157 associated with disease in the United Kingdom. J Med Microbiol. 2003; 52: 941-7.



56. Jiang ZD, Greenberg D, Nataro JP, Steffen R, DuPont HL. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. J Clin Microbiol. 2002; 40: 4185-90.
57. June RC, Ferguson WW, Worfel MT. Experiments in feeding adult volunteers with *Escherichia coli* 55, B5, a coliform organism associated with infant diarrhea. Am J Hyg. 1953; 57: 222-36.
58. Kaper JB. Defining EPEC. Rev Microbiol. 1996; 27:130-3.
59. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2004; 2: 123-40.
60. Kaplan B. Recent advances in the understanding of the pathogenesis of HUS. Pediatr Nephrol. 1990; 4: 276-81.
61. Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, Isaac-Renton J, Clark C, Rahn K, Kaper JB. Association of genomic Oisland 122 of *Escherichia coli* EDL933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. J Clin Microbiol. 2003; 41: 4930-40.
62. Keskimäki M, Ikäheimo R, Kärkkäinen P, Scheutz F, Puohiniemi RL, Siitonen A. Shiga toxin producing *Escherichia coli* serotype OX3:H21 causing hemolytic uremic syndrome. Clin Infect Dis. 1997; 24: 1278-9.
63. Ketyi I. Epidemiology of the enteroinvasive *Escherichia coli*. Observations in Hungary. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol. 1989; 33: 261-7.
64. Klapproth JM, Scaletsky IC, McNamara BP, Lai LC, Malstrom C, James SP, Donnenberg MS. A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* strains that inhibits lymphocyte activation. Infect Immun. 2000; 68: 2148-55.
65. Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immun. 1977; 18: 775-9.
66. Kucharzik T, Hudson JT III, Lügering A, Abbas JA, Bettini M, Lake JG, Evans ME, Ziegler TR, Merlin D, Madara JL, Williams IR. Acute induction of human IL-8 production by intestinal epithelium triggers neutrophil infiltration without mucosal injury. Gut 2005; 54: 1565-72.



67. Lasaro MA, Rodrigues JF, Mathias-Santos C, Guth BE, Balan A, Sbrogio-Almeida ME, Ferreira L. Genetic diversity of heat-labile toxin expressed by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. J Bacteriol. 2008; 190: 2400-10.
68. Levine MM, Bergquist EJ, Nalin DR, Waterman DH, Hornick RB, Young CR, Sotman S. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. Lancet. 1978; 1: 1119-22.
69. Levine MM, Nataro JP, Karch H, Baldini MM, Kaper JB, Black RE, Clements ML, O'Brien AD. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. J Infect Dis. 1985; 152: 550-9.
70. Levine MM, Ferreccio C, Prado V, Cayazzo M, Abrego P, Martinez J, Maggi L, Baldini MM, Martin W, Maneval D. Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. Am J Epidemiol. 1993; 138: 849-69.
71. Lima AA, Guerrant RL. Persistent diarrhea in children: epidemiology, risk factors, pathophysiology, nutritional impact, and management. Epidemiol Rev. 1992; 14: 222-42.
72. Manning SD, Motiwala AS, Springman AC, Qi W, Lacher DW, Ouellette LM, Mladonicky JM, Somsel P, Rudrik JT, Dietrich SE, Zhang W, Swaminathan B, Alland D, Whittam TS. Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105: 4868-73.
73. Masana MO, Leotta GA, Del Castillo LL, D'Astek BA, Palladino PM, Galli L, Vilacoba E, Carbonari C, Rodríguez HR, Rivas M. Prevalence, characterization, and genotypic analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from selected beef exporting abattoirs of Argentina. J Food Prot. 2010; 73: 649-56.
74. Masana MO, D'Astek BA, Palladino PM, Galli L, Del Castillo LL, Carbonari C, Leotta GA, Vilacoba E, Irino K, Rivas M. Genotypic characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef abattoirs of Argentina. J Food Prot. 2011; 74: 2008-17.
75. Mead PS, Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7. Lancet. 1998; 352: 1207-12.



76. Meichtri L, Miliwebsky E, Gioffré A, Chinen I, Baschkier A, Chillemi G, Guth BE, Masana MO, Cataldi A, Rodríguez HR, Rivas M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *Int J Food Microbiol.* 2004; 96: 189-98.
77. Mellor GE, Sima EM, Barlowa RS, D'Astek BA, Galli L, Chinen I, Rivas M, Gobius KS. Phylogenetically related Argentinean and Australian *Escherichia coli* O157 are distinguished by virulence clades and alternative Shiga toxin 1 and 2 prophages. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78: 4724-31.
78. Mohamed JA, DuPont HL, Jiang ZD, Belkind-Gerson J, Figueroa JF, Armitige LY, Tsai A, Nair P, Martinez-Sandoval FJ, Guo DC, Hayes P, Okhuysen PC. A novel single-nucleotide polymorphism in the lactoferrin gene is associated with susceptibility to diarrhea in North American travelers to Mexico. *Clin Infect Dis.* 2007; 44: 945-52.
79. Monteiro-Neto V, Bando SY, Moreira-Filho CA, Girón JA. Characterization of an outer membrane protein associated with haemagglutination and adhesive properties of enteroaggregative *Escherichia coli* O111:H12. *Cell Microbiol.* 2003; 5: 533-47.
80. Mueller M, Grauschopf U, Maier T, Glockshuber R, Ban N. The structure of a cytolytic alpha-helical toxin pore reveals its assembly mechanism. *Nature* 2009; 459: 726-30.
81. Nataro JP, Baldini MM, Kaper JB, Black RE, Bravo N, Levine MM. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. *J Infect Dis.* 1985; 152: 560-5.
82. Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P, Levine MM. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J.* 1987; 6: 829-31.
83. Nataro JP, Deng Y, Maneval DR, German AL, Martin WC, Levine MM. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect Immun.* 1992; 60: 2297-304.
84. Nataro JP, Deng Y, Cookson S, Cravioto A, Savarino SJ, Guers LD, Levine MM, Tacket CO. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *J Infect Dis.* 1995; 171: 465-8.



85. Nataro JP, Hicks S, Phillips AD, Vial PA, Sears CL. T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Infect Immun.* 1996; 64: 4761-8.
86. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11: 142-201.
87. Neter E, Westphal O, Luderitz O, Gino RM, Gorzynski EA. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. *Pediatrics* 1955; 16: 801-8.
88. Nicholls L, Grant TH, Robins-Browne RM. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol Microbiol.* 2000; 35: 275-88.
89. Nishikawa Y, Zhou Z, Hase A, Ogasawara J, Cheasty T, Haruki K. Relationship of genetic type of Shiga toxin to manifestation of bloody diarrhea due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O157 isolates in Osaka City, Japan. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 2440-2.
90. O'Brien AD, La Veck GD, Thompson MR, Formal SB. Production of *Shigella dysenteriae* type-1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 1982; 146: 763-9.
91. Ochoa TJ, Barletta F, Contreras C, Mercado E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008; 102: 852-6.
92. Ochoa TJ, Ecker L, Barletta F, Mispireta ML, Gil AI, Contreras C, Molina M, Amemiya I, Verastegui H, Hall ER, Cleary TG, Lanata CF. Age-related susceptibility to infection with diarrheagenic *Escherichia coli* among infants from Periurban areas in Lima, Peru. *Clin Infect Dis.* 2009; 49: 1694-702.
93. Pál T, Pácsa S, Emody L, Vörös S. Antigenic relationship among virulent enteroinvasive *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* detected by ELISA. *Lancet.* 1983; 2: 102.
94. Palmeira P, Costa-Carvalho BT, Arslanian C, Pontes GN, Nagao AT, Carneiro-Sampaio MM. Transfer of antibodies across the placenta and in breast milk from mothers on intravenous immunoglobulin. *Pediatr Allergy Immunol.* 2009; 20: 528-35.



95. Parma AE, Sanz ME, Blanco JE, Blanco J, Blanco M, Padola NL, Etcheverría AI. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. *Eur J Epidemiol.* 2000; 16: 757-62.
96. Parsot C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiol.* 2005; 252: 11-8.
97. Pass MA, Odedra R, Batt RM. Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 2001-4.
98. Patel SK, Dotson J, Allen KP, Fleckenstein JM. Identification and molecular characterization of EatA, an autotransporter protein of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2004; 72: 1786-94.
99. Paton AW, Woodrow MC, Doyle RM, Lanser JA, Paton JC. Molecular characterization of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 3357-61.
100. Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun.* 2001; 69: 6999-7009.
101. Pereira AC, Britto-Filho JD, de Carvalho J, de Luna MD, Rosa AC. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains enter and survive within cultured intestinal epithelial cells. *Microb Pathog.* 2008; 45: 310-4.
102. Phillips AD, Frankel G. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. *J Infect Dis.* 2000; 181: 1496-500.
103. Ramos HC, Rumbo M, Sirard JC. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol.* 2004; 12: 509-17.
104. Rendon MA, Saldana Z, Erdem AL, Monteiro-Neto V, Vázquez A, Kaper JB, Puente JL, Girón JA. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104: 10637-42.



105. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* O157:H7 serotype. *N Engl J Med*. 1983; 308: 681-5.
106. Rockabrand DM, Shaheen HI, Khalil SB, Peruski LF Jr, Rozmajzl PJ, Savarino SJ, Monteville MR, Frenck RW, Svennerholm AM, Putnam SD, Sanders JW. Enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factor types collected from 1997 to 2001 in US military personnel during operation Bright Star in northern Egypt. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006; 55: 9-12.
107. Rodrigues J, Scaletsky IC, Campos LC, Gomes TA, Whittam TS, Trabulsi LR. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. *Infect Immun*. 1996; 64: 2680-6.
108. Romero Cabello R, Herrera Benavente IF. Síndrome diarreico infeccioso. Editorial Médica Panamericana, 2002.
109. Rowe PC, Orbine E, Wells OA, McLaine PN. Epidemiology of hemolytic-uremic syndrome in Canadian children from 1986 to 1988. The Canadian Pediatric Kidney Disease Reference Centre. *J Pediatr* 1991; 119: 218-24.
110. Ruiting L, Reeves PR. *Escherichia coli* in disguise: molecular origins of *Shigella*. *Rev Microb Infect*. 2002; 4: 1125-32.
111. Ruttler ME, Renna NF, Balbi L, García B, Guidone L, Fernández R, Puig O, Ortiz A. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children with acute diarrhea, in Mendoza, Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2002; 34: 167-70.
112. Sack RB, Gorbach SL, Banwell JG, Jacobs B, Chatterjee BD, Mitra RC. Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients with severe cholera-like disease. *J Infect Dis*. 1971; 123: 378-85.
113. Samie A, Obi CL, Dillingham R, Pinkerton RC, Guerrant RL. Enteraggregative *Escherichia coli* in Venda, South Africa: distribution of virulence-related genes by multiplex polymerase chain reaction in stool samples of human immunodeficiency virus (HIV)- positive and HIV-negative individuals and primary school children. *Am J Trop Med Hyg*. 2007; 77: 142-50.



114. Savarino SJ, Fasano A, Watson J, Martin BM, Levine MM, Guandalini S, Guerry P. Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3093-7.
115. Scaletsky IC, Silva ML, Trabulsi LR. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun*. 1984; 45: 534-6.
116. Scaletsky IC, Fabbricotti SH, Silva SO, Morais MB, Fagundes-Neto U. HEp-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, Sao Paulo, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2002a; 8: 855-8.
117. Scaletsky IC, Fabbricotti SH, Aranda KR, Morais MB, Fagundes-Neto U. Comparison of DNA hybridization and PCR assays for detection of putative pathogenic enteroadherent *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2002b; 40: 1254-8.
118. Scheutz F, Møller Nielsen E, Frimodt-Møller J, Boisen N, Morabito S, Tozzoli R, Nataro JP, Caprioli A. Characteristics of the enterotoxigenic Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. *Euro Surveill* 2011; 16(24): pii=19889. [On-line]
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19889>.
119. Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H, Mellmann A, Caprioli A, Tozzoli R, Morabito S, Strockbine NA, Melton-Celsa AR, Sanchez M, Persson S, O'Brien AD. A multi-center evaluation of a sequence-based protocol to subtype Shiga toxins and standardize Stx2 nomenclature. *J Clin Microbiol*. 2012; 50: 2951-63.
120. Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun*. 1995; 63: 1055-61.
121. Schulz G, Schulz C, Yuen P, Garbers DL. Guanylyl cyclase is a heat stable toxin receptor. *Cell*. 1990; 63: 941-48.
122. Scotland SM, Willshaw GA, Smith HR, Said B, Stokes N, Rowe B. Virulence properties of *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O26, O55, O111 and O128 isolated in the United Kingdom in 1991 from patients with diarrhoea. *Epidemiol Infect*. 1993; 111: 429-38.



123. Sereny B. Experimental keratoconjunctivitis shigellosa. *Acta Microbiol Acad Sci Hung.* 1957; 4: 367-6.
124. Sethabutr O, Venkatesan M, Murphy GS, Eampokalap B, Hoge CW, Echeverria P. Detection of shigellae and enteroinvasive *E. coli* by amplification of the invasion plasmid antigen H DNA sequence in patients with dysentery. *J Infect Dis.* 1993; 167: 458-61.
125. Shah N, DuPont HL, Ramsey DJ. Global etiology of travelers' diarrhea: systematic review from 1973 to the present. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 80: 609-14.
126. Silva ML, Giampaglia CM. Colostrum and human milk inhibit localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Acta Paediatr.* 1992; 81: 266-7.
127. Silva RS, Toledo MRF, Trabulsi LR. Biochemical and cultural characteristics of invasive *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 1980; 11: 441-4.
128. Smith HR, Cheasty T, Rowe B. Enteroaggregative *Escherichia coli* and outbreaks of gastroenteritis in UK. *Lancet*, 1997; 350: 814-5.
129. Sobel J, Gomes TA, Ramos RT, Hoekstra M, Rodrigue D, Rassi V, Griffin PM. Pathogen-specific risk factors and protective factors for acute diarrheal illness in children aged 12-59 months in Sao Paulo, Brazil. *Clin Infect Dis.* 2004; 38: 1545-51.
130. Spizzirri FD, Rahman RC, Bibiloni N, Ruscasso JD, Amoreo OR. Childhood hemolytic uremic syndrome in Argentina: long-term follow-up and prognostic features. *Pediatr Nephrol.* 1997; 11: 156-60.
131. Suzart S, Guth BE, Pedroso MZ, Okafor UM, Gomes TA. Diversity of surface structures and virulence genetic markers among enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains with and without the EAEC DNA probe sequence. *FEMS Microbiol Lett.* 2001; 201: 163-8.
132. Swerdlow DL, Griffin PM. Duration of faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 among children in day-care centres. *Lancet* 1997; 349: 745-6.
133. Tarr P. *Escherichia coli* O157:H7: Clinical, diagnostic and epidemiological aspects of human infections. *Clin Infect Dis.* 1995; 20: 1-10.
134. Tarr PI, Bilge SS, Vary JC, Jelacic S, Habeeb RL, Ward TR, Baylor MR, Besser TE. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence- conferring molecule encoded



- on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun.* 2001; 68: 1400-7.
135. Tatsuno I, Horie M, Abe H, Miki T, Makino K, Shinagawa H, Taguchi H, Kamiya S, Hayashi T, Sasakawa C. *tox*B gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun.* 2001; 69: 6660-9.
 136. Taylor CJ, Hart A, Batt RM, McDougall C, McLean L. Ultrastructural and biochemical changes in human jejunal mucosa associated with enteropathogenic *Escherichia coli* (O111) infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1986; 5: 70-3.
 137. Taylor KA, O'Connell CB, Luther PW, Donnenberg MS. The EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is targeted to the cytoplasm of infected HeLa cells. *Infect Immun.* 1998; 66: 5501-7.
 138. Tikhomirov E. WHO programme for the control of hospital infections. *Chemioterapia.* 1987; 6: 148-51.
 139. Toledo MR, Alvariza Mdo C, Murahovschi J, Ramos SR, Trabulsi LR. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. *Infect Immun.* 1983; 39: 586-9.
 140. Toma C, Lu Y, Higa N, Nakasone N, Chinen I, Baschkier A, Rivas M, Iwanaga M. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 2669-71.
 141. Torres AG, Giron JA, Perna NT, Burland V, Blattner FR, Avelino-Flores F, Kaper JB. Identification and characterization of *lpt*ABCC'DE, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun.* 2002; 70: 5416-27.
 142. Torres AG, Zhou X, Kaper JB. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun.* 2005; 73: 18-29.
 143. Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 508-13.
 144. Turner SM, Scott-Tucker A, Cooper LM, Henderson IR. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 263: 10-20.



145. Tzipori S, Montanaro J, Robins-Browne RM, VialP, GibsonR, LevineMM. Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. Infect Immun. 1992; 60: 5302-6.
146. Uber AP, Trabulsi LR, Irino K, Beutin L, Ghilardi AC, Gomes TA, Liberatore AM, de Castro AF, Elias WP. Enteroaggregative *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. FEMS Microbiol Lett. 2006; 256: 251-7.
147. Varela G, Aguirre A, Carrillo J. *Escherichia coli-gomez* nueva especie aislada de un caso mortal de diarrea. Bol Med Hosp Infant Mex 1946; 3(3).
148. Vial PA, Robins-Browne R, Lior H, Prado V, Kaper JB, Nataro JP, Maneval D, Elsayed A, Levine MM. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. J Infect Dis. 1988; 158: 70-9.
149. Vidal RM, Valenzuela P, Baker K, Lagos R, Esparza M, Livio S, Farfán M, Nataro JP, Levine MM, Prado V. Characterization of the most prevalent colonization factor antigens present in Chilean clinical enterotoxigenic *Escherichia coli* strains using a new multiplex polymerase chain reaction. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009; 65: 217-23.
150. Watanabe H, Wada A, Inagaki Y, Itoh K, Tamura K. Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan. Lancet. 1996; 348: 81-2.
151. Wenneras C, Erling V. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli*-associated diarrhoea and carrier state in the developing world. J Health Popul Nutr. 2004; 22: 370-82.
152. Wolf MK. Occurrence, distribution and associations of O and H serogroups colonization factor antigens and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1997; 10: 569-84
153. World Health Organization (WHO). Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections. Report of a WHO Consultation. World Health Organization, Geneva, 1997.



154. Yuichiro T, Narimatsu H, Miyazato T, Nakasone N, Higa N, Toma C, Iwanaga M. The relationship between O-antigens and pathogenic genes of diarrhea-associated *Escherichia coli*. Jpn J Infect Dis. 2005; 58: 65-9.
155. Zhang WL, Kohler B, Oswald E, Beutin L, Karch H, Morabito S, Caprioli A, Suerbaum S, Schmidt H. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol. 2002; 40: 4486-92.



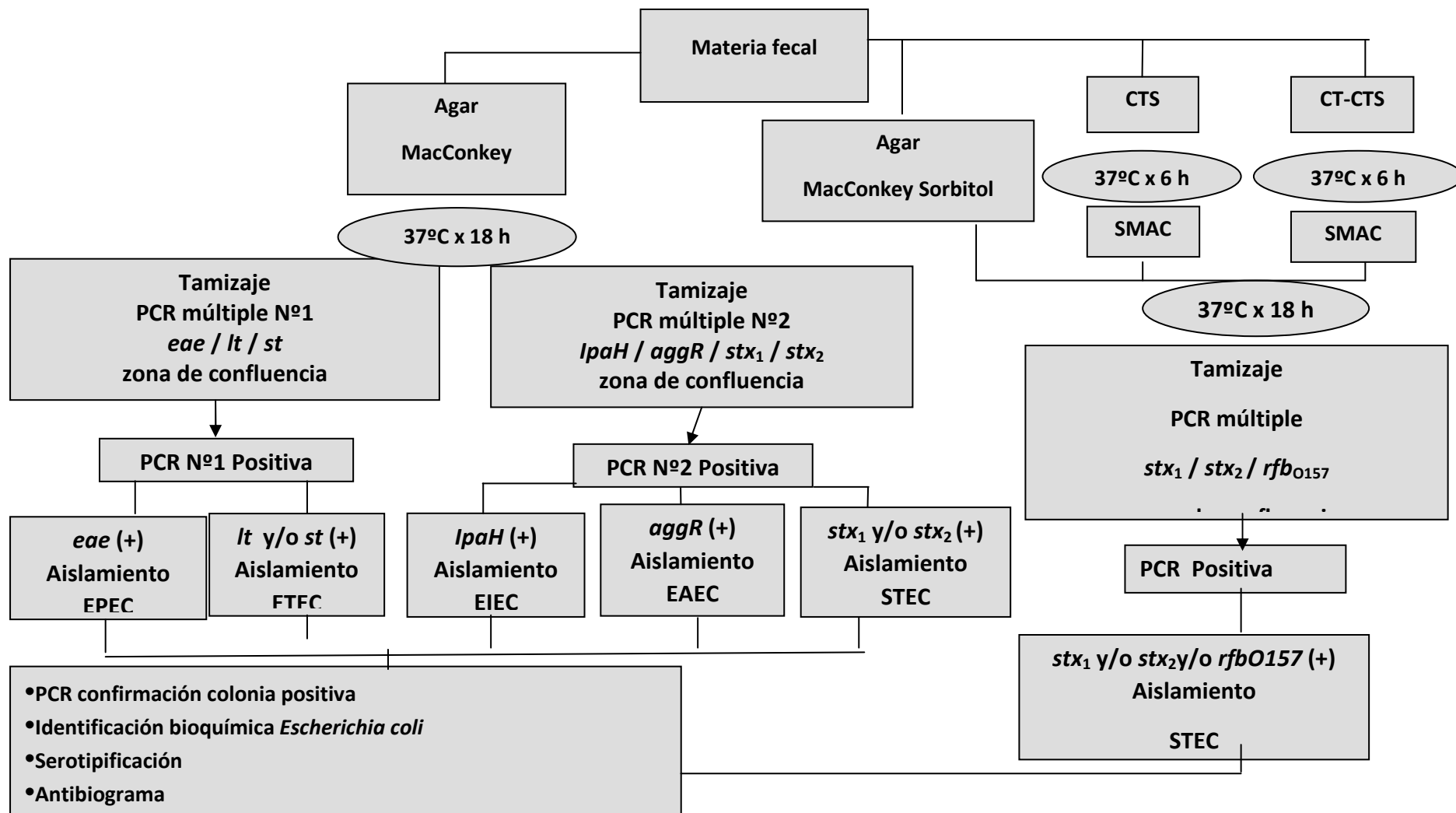


Figura 2. Algoritmo para el diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli*, diarreigénico EPEC, ETEC, EIEC, EAEC y STEC.



Parte II.c.1

ENTEROBACTERIAS

Capítulo II.c.1.2

***Shigella* spp.**

MARIANA PICHEL

Ex Profesional del Servicio Enterobacterias del Departamento Bacteriología del
I.N.E.I. – A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”
Correo electrónico: pichel1545@gmail.com

MARÍA INÉS CAFFER

Jefa del Servicio Enterobacterias del Departamento Bacteriología del I.N.E.I. –
A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”
Correo electrónico: micaffer@anlis.gov.ar



Aspectos taxonómicos

El género *Shigella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y está compuesto por bacilos gram negativos, no móviles y no formadores de esporas. Históricamente, *Shigella* fue descrita por primera vez en 1897 por el médico japonés Kiyoshi Shiga como *Bacillus dysenteriae*, agente causal de disentería bacilar, distinguiendo así a estos microorganismos de *Bacillus coli* (hoy *Escherichia coli*), conocido entonces como un microorganismo comensal³⁹. Desde los años cuarenta se reconocieron cuatro especies de *Shigella* en base a diferencias antigénicas y de propiedades bioquímicas, como lo documentó Ewing^{8, 9}: *S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri* y *S. sonnei*, conocidas también como serogrupos A, B, C y D respectivamente.

Sin embargo, *Shigella* y *E. coli* siempre se reconocieron como microorganismos muy relacionados y se ha demostrado desde hace varios años que presentan similitud suficiente como para considerarlos miembros de una misma especie^{9, 31, 38}. Esta relación se demostró por diversos estudios basados en electroforesis multilocus enzimático, similitud nucleotídica de 80-90 %, análisis del gen que codifica la subunidad ribosomal de ARN 16S^{2, 5, 30} y comparación de secuencias de diversos genes *housekeeping*, genes de virulencia y genomas completos^{17, 22, 26, 39}. A pesar de estas evidencias, se tomó como decisión taxonómica mantener la clasificación en estos dos géneros, principalmente debido a las diferencias en las presentaciones clínicas asociadas a cada uno, la gravedad del cuadro de disentería y su asociación con el nombre del género *Shigella*.



Hábitat y aspectos epidemiológicos

El intestino humano es reconocido como el hábitat y reservorio natural de *Shigella* spp., aunque también se ha aislado de primates, como monos y chimpancés. *Shigella* se transmite en forma directa por vía fecal-oral en condiciones higiénicas deficientes y la infección puede adquirirse por ingesta de agua o alimentos contaminados con heces humanas^{47, 52}.

La dosis infectiva es muy baja, ya que 10 a 100 microorganismos son suficientes para causar enfermedad⁶. Distintos estudios postularon que esto podría atribuirse parcialmente a la presencia de sistemas de resistencia al ácido que permiten la supervivencia en el ambiente del estómago, como se observó en *S. flexneri*¹⁵. Asimismo, se ha demostrado que *Shigella* spp. es capaz de inhibir la expresión de péptidos antimicrobianos, que se producen constantemente en la mucosa del tracto intestinal²⁰.

La morbilidad y mortalidad asociadas a las infecciones por *Shigella* spp. son un problema importante de salud en el mundo, especialmente en países en desarrollo, donde las condiciones sanitarias son inadecuadas²⁴. Se estima que anualmente ocurren aproximadamente 165 millones de casos con 1.100.000 muertes^{25, 47}. En la Argentina, *Shigella* spp. está reconocida como el principal agente causal de diarreas bacterianas y afecta principalmente a los menores de cinco años²⁸. Los casos presentan un patrón estacional con aumento de las infecciones en el período estival. Se han observado numerosos brotes familiares, en el ámbito de instituciones cerradas como jardines maternos y comedores debido a la transmisión entre personas y/o por contaminación de



alimentos durante su manipulación. También se registraron brotes en la comunidad, asociados a deficiencias en el tratamiento o disponibilidad de agua para consumo^{4, 37, 44}.

Aspectos patogénicos

Shigella spp. es un patógeno invasivo, capaz de atravesar el epitelio intestinal, evadir la degradación por macrófagos y diseminarse a las células intestinales adyacentes. La mayor parte de los conocimientos actuales sobre patogénesis se basan en estudios realizados en *S. flexneri*, aunque recientemente la determinación de las secuencias genómicas completas de diferentes cepas ha permitido ampliar la información sobre los genes involucrados en la evolución y los mecanismos de patogénesis de las cuatro especies de *Shigella*^{3, 22, 43, 45, 49, 50}.

La infección por *S. flexneri* es un proceso de múltiples etapas (Figura 1). La bacteria atraviesa el epitelio intestinal, no a través de la membrana apical de los enterocitos, sino causando su propia internalización por parte de las células M. Desde allí es translocada a la mucosa intestinal, donde es capturada por los macrófagos. Las células M son células especializadas que continuamente toman partículas del lumen y las translocan a la mucosa, donde se dispara la respuesta inmune. Dentro de los macrófagos, *Shigella* spp. evade la degradación induciendo un mecanismo similar a la apoptosis, que desencadena señales proinflamatorias. Las bacterias libres invaden las células epiteliales desde la membrana basolateral, se mueven en el citoplasma por



polimerización de la actina y se desplazan a células vecinas. Las señales proinflamatorias activan la respuesta inmune innata con células “*natural killers*” y atracción de polimorfonucleares (PMN). El influjo de PMN desintegra el epitelio facilitando la invasión de un mayor número de bacterias. Finalmente los PMN fagocitan y matan a las bacterias patógenas, contribuyendo a la resolución de la infección⁴³.

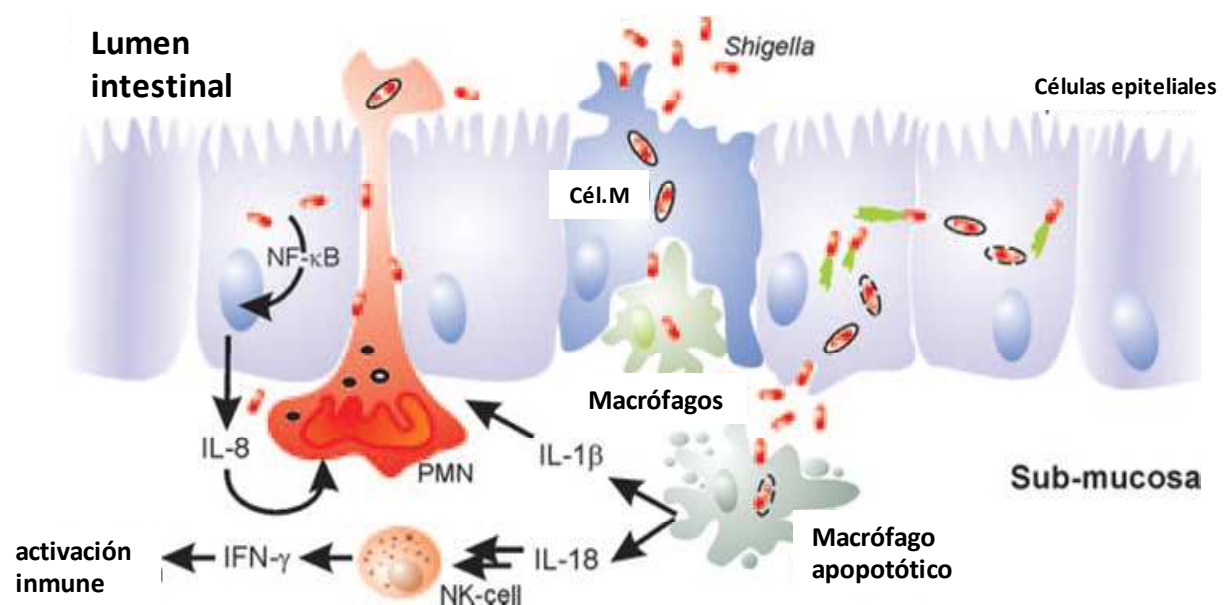


Fig. 1 Patogénesis de *Shigella* spp., basado en estudios de *S. flexneri*. Figura adaptada de Schroeder et al.⁴²

Marcadores de virulencia

Los determinantes de patogénesis de *Shigella* spp. están codificados en el cromosoma de la bacteria y en un gran plásmido de virulencia. El plásmido lleva la información genética para la síntesis de la maquinaria molecular



necesaria para la invasión de tejidos y para la supervivencia intracelular^{41, 42}. El elemento principal de esta maquinaria es un sistema de secreción tipo III (T3SS), que le permite a la bacteria translocar un grupo de aproximadamente 25 proteínas efectoras desde su citoplasma a la célula eucariota, donde interfieren con varios procesos de las células del hospedero^{32, 33}.

Recientemente se han determinado las secuencias completas de los plásmidos de virulencia y los genomas de varias cepas del género *Shigella*, incluyendo aislamientos de las cuatro especies^{3, 22, 43, 45, 49, 50}. Esta información permitió identificar los eventos implicados en la evolución de *Shigella* a partir de ancestros no patógenos de *E. coli*. (Figura 2). Tanto en el cromosoma como en el plásmido de virulencia de *Shigella* se observan evidencias de la dinámica de adquisición de genes por transferencia horizontal, como numerosas secuencias de inserción (IS) y marcadores de rearrreglos genómicos, como las islas de patogenicidad^{3, 22}.

La presencia y distribución de las islas de patogenicidad de *Shigella* (SHI) difieren entre distintas cepas y pueden contribuir a la diversidad de fenotipos de virulencia^{34, 54}. Hasta ahora, solo se conoce la función de algunos de los genes contenidos en estos elementos móviles, como la proteasa SigA y la enterotoxina ShET1, que inducen acumulación de fluido en el modelo de asa ligada de conejo^{1, 12, 13}.



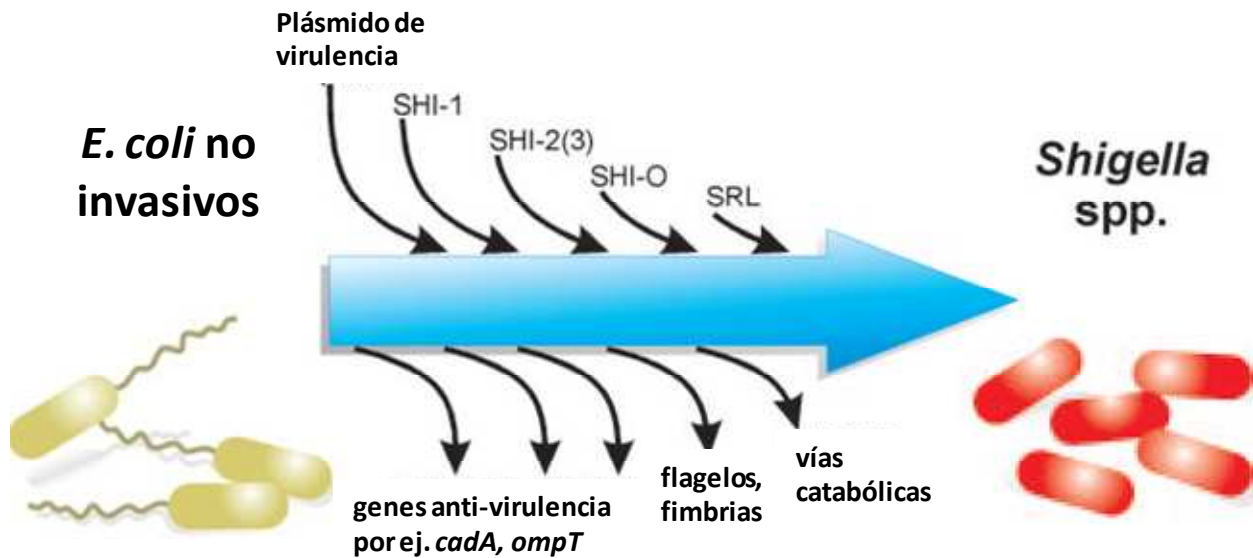


FIG. 2. Eventos genéticos que contribuyeron a la evolución de *Shigella* spp. a partir de ancestros no patogénicos de *E. coli*: adquisición del gran plásmido de virulencia y de islas de patogenicidad -SHI-1, SHI-2³, SHI-O y SRL- y pérdida de *loci* genéticos, que resultaban no funcionales intracelularmente o impedían la virulencia, como flagelos y fimbrias y proteínas con funciones catabólicas. Figura adaptada de Schroeder et al. 2008.

Impacto clínico

La gravedad y la letalidad de las infecciones causadas por *Shigella* spp. dependen de la edad de la persona, del estado nutricional, de la magnitud de la dosis infectante y del serotipo del microorganismo. Excepto *S. dysenteriae* serotipo 1, la mayoría de los serotipos de *Shigella* causan diarrea, que puede estar acompañada por fiebre y dolores abdominales, con inicio de los síntomas uno o dos días después de la exposición a la bacteria. La diarrea es frecuentemente sanguinolenta y/o inflamatoria (disentería) y suele resolverse

de 5 a 7 días en pacientes inmunocompetentes. Se han descrito cuadros con convulsiones en niños menores de 2 años con fiebre alta. Algunas personas pueden ser portadoras asintomáticas de *Shigella* spp. y transmitir la bacteria a otros pacientes susceptibles⁴.

S. dysenteriae serotipo 1 produce la forma más severa de la enfermedad, con una tasa de letalidad del 20%¹⁰. Los microorganismos de este serotipo, no identificado hasta ahora en la Argentina, son capaces además de producir toxina Shiga, ocasionando el síndrome urémico hemolítico. *S. flexneri* también puede producir disentería y es el serogrupo más frecuente en nuestro país, seguido por *S. sonnei*; mientras que *S. boydii* y *S. dysenteriae* de serotipos diferentes al 1 se aíslan con menor frecuencia.

Identificación a nivel de género y especie

Examen microscópico

Shigella spp. son bacilos gram negativos, no móviles y no formadores de esporas. El examen microscópico de la materia fecal puede ser útil para distinguir características diferenciales entre la disentería bacilar y la causada por parásitos como amebas, según se describe en la Tabla 1⁵³.



Tabla 1: Diferencias entre disentería bacilar y amebiana

Característica	Disentería bacilar	Disentería amebiana
Leucocitos	Numerosos	Escasos
Eritrocitos	Dispersos	En aglomerados
Eosinófilos	Ausentes o escasos	Presentes
Macrófagos	Presentes	Ausentes
Cristales de Charcot Leyden	Ausentes	Presentes
<i>Entamoeba histolytica</i>	Ausente	Trofozoítos +
Bacterias	Escasas, no móviles	Numerosas, móviles
Crecimiento en agar MacConkey	Positivo para <i>Shigella</i>	Negativo

Procesamiento de muestras y características culturales

Para la búsqueda de *Shigella* spp. en pacientes con diarrea, se deben obtener las muestras en el período agudo de la enfermedad, antes de iniciar el tratamiento con antimicrobianos. Se pueden procesar muestras de materia fecal o utilizar un hisopo de algodón estéril para recoger material mucoso o sanguinolento de las heces. Las muestras que no se van a procesar en dos horas se deben mantener en medio de transporte Cary-Blair con tioglicolato que reduce la tensión de oxígeno. Este medio tiene la ventaja de ser estable hasta 18 meses después de su preparación, cuando las condiciones de almacenamiento son correctas. Las muestras deben procesarse lo antes



posible, ya que *Shigella* spp. es sensible a los cambios de pH que ocurren en las muestras, aún en refrigeración.

No hay un medio de enriquecimiento específico para el cultivo y aislamiento de *Shigella* spp. de materia fecal. Si se dispone de caldo GN (del inglés: *Gram Negative*) de Hajna, se lo puede usar para el enriquecimiento. Otra posibilidad es resuspender el hisopo con materia fecal en un caldo tioglicolato y luego estriar una placa con medio de cultivo apropiado.

Los medios de cultivo que pueden utilizarse para el aislamiento se describen a continuación junto a las características culturales de *Shigella* spp. en cada uno de ellos (Tabla 2). Se deben sembrar las muestras de materia fecal suspendidas en solución salina o estriar a partir del hisopo e incubar las placas por 18-24 h a 37 °C.

Tabla 2. Características culturales de *Shigella* spp.

Medio de cultivo	Aspecto de las colonias de <i>Shigella</i> spp. (colonias convexas de 2 a 4 mm de diámetro)
Agar MacConkey	colonias translúcidas, ligeramente rosadas
Agar Hektoen	colonias verdes, elevadas y húmedas
Agar SS (<i>Salmonella-Shigella</i>)	translúcidas, ligeramente rosadas, a veces con un centro más oscuro
Agar XLD (xilosa lisina desoxicolato)	colonias translúcidas con un tono rojizo
Agar EMB (eosina azul de metileno)	colonias translúcidas de color ámbar

Pruebas bioquímicas y serológicas

Las colonias características se siembran en estrías de agar tripteína de soja (TSA), en agar hierro tres azúcares (TSI) y en agar lisina hierro (LIA),



llavecomún para identificación de *Salmonella* spp. y se incuban a 37 °C, durante 18 - 24 h. A partir de la estría en TSA se realizan las pruebas bioquímicas complementarias y la serotipificación.

La mayoría de las cepas de *Shigella* spp. producen las siguientes reacciones: TSI: alcalino/ácido, sin producción de gas ni de H₂S, lo que indica que no fermentan la lactosa y sí fermentan la glucosa. La producción de gas es rara, aunque se puede observar ocasionalmente en cepas de *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. dysenteriae*. Los aislamientos son siempre inmóviles y lisina negativos.

Las características bioquímicas generales de *Shigella* spp. se detallan en la Tabla 3.

TABLA 3. Propiedades bioquímicas de *Shigella* spp.

Ensayo o Sustrato	Resultado
Sulfuro de hidrógeno	-
Glucosa (gas)	-
Glucosa (ácido)	+
Movilidad	-
Citrato de Simmons	-
Adonitol	-
Mucato	-
Rojo de metilo	+
Voges-Proskauer	-
Arginina dihidrolasa	-
Lisina descarboxilasa	-
Ornitina descarboxilasa	<i>S. sonnei</i> +; otras especies—
Ureasa	-
Fenilalanina desaminasa	-
Salicina	-
Lactosa	-
Sacarosa	-
Xilosa	-



Pruebas bioquímicas diferenciales

a) Entre especies de *Shigella*

Además de sus características antigénicas, las cuatro especies reconocidas del género *Shigella* presentan algunas propiedades bioquímicas diferenciales, que se resumen en la Tabla 4.

- *S. flexneri*: la mayoría de las cepas fermentan manitol y son ornitina descarboxilasa negativas.

- *S. boydii*: la mayoría de las cepas fermentan manitol, son ornitina descarboxilasa negativas y tienen propiedades bioquímicas diferenciales entre los serotipos.

- *S. sonnei*: son indol negativas, ornitina descarboxilasa positivas, dan positiva la prueba ONPG y fermentan el manitol.

TABLA 4. Reacciones bioquímicas de *Shigella* spp.

Especie	D-manitol	ONPG	Ornitina
<i>S.dysenteriae</i> ^a	-	-	-
<i>S. flexneri</i>	+	-	-
<i>S. sonnei</i>	+	+	+
<i>S. boydii</i>	+	-	-

^a*S. dysenteriae* serotipo 1 es arabinosa e indol negativa y da positiva la prueba de ONPG muy rápidamente.



b) Entre *Shigella* spp. y *Escherichiacoli*

Las principales características para distinguir *Shigella* de *E. coli* fueron originalmente la inmovilidad y la incapacidad de fermentar la lactosa. Al identificarse aislamientos patógenos de *E. coli* que compartían estas mismas propiedades, como así también la capacidad invasiva de *Shigella*, en la década de los 40, fue necesario buscar pruebas adicionales que ayudaran a diferenciar ambos géneros. Estas cepas de *E. coli* se denominaron enteroinvasivas o EIEC, por su nombre en inglés “*enteroinvasive E. coli*” (ver el capítulo anterior, pág. 28).

La diferenciación de *Shigella* spp. respecto a EIEC es uno de los problemas con que se enfrenta el laboratorio de microbiología y refleja el hecho de que *E. coli* y las cuatro especies de *Shigella* están estrechamente relacionadas entre sí sobre la base de estudios de hibridación ADN-ADN. Esto hace que incluso tecnologías modernas, como las basadas en espectrometría de masas no puedan resolver dicha diferenciación. En consecuencia, el diagnóstico debe confirmarse por pruebas bioquímicas, de serotipificación o por la identificación de genes específicos asociados a estas propiedades.

En la Tabla 5 se describen los ensayos recomendados por Edwards y Ewing⁹, para la diferenciación de *E. coli* y *Shigella* spp.

Las pruebas citrato de Christensen, acetato de sodio y mucato de sodio son las de mayor valor en la diferenciación de los dos géneros.



TABLA 5. Diferenciación de *Shigella* spp. y *E. coli*.

Prueba	<i>Shigella</i>	<i>E. coli</i>
Mucato	-	+
Acetato	-	+ o (+)
Citrato de Christensen	-	+, (+), -
Indol (producción)	- o +	+
Lisina descarboxilasa	-	+, (+), -
Ornitina descarboxilasa	- o +	+, (+), -
Arginina dihidrolasa	+, (+), -	+, (+), -
Glucosa (gas)	-	+
Sacarosa	+, (+), -	+, (+), -
Salicina	-	+, (+), -
Movilidad	-	+ ó -

+ 90% o más positivo en 1-2 días; (+) positivo tardío; - 90% o más negativo.

Serotipificación

El uso de métodos de serotipificación con propósitos de vigilancia epidemiológica se basa en el hecho que los microorganismos muestran variaciones en su composición antigénica. Las bacterias producen una variedad de antígenos: componentes estructurales de la célula (constituyentes de la pared celular, cápsulas, envolturas, flagelos, fimbrias), productos de secreción de las células (toxinas, enzimas extracelulares) o antígenos contenidos en el interior de las mismas. Químicamente, los antígenos usados



con este propósito pueden ser proteínas, carbohidratos, o mezclas de ambos componentes.

Debido a la característica del género *Shigella* de ser bacilos gram negativos inmóviles, solamente se ponen en evidencia los antígenos somáticos (antígeno O).

El antígeno O (Ag O) que contiene unidades repetitivas de oligosacáridos, forma parte del lipopolisacárido (LPS), presente en la membrana externa de las bacterias gram negativas. El Ag O muestra variaciones en los tipos de azúcares presentes, en su orden dentro de la unidad O y en las uniones dentro y entre las unidades O, que hacen al LPS uno de los constituyentes más variables de la célula bacteriana.

La variabilidad del Ag O, proporciona la base principal para los esquemas de serotipificación para muchas bacterias gram negativas. Es el único antígeno usado para *Shigella*, que es un importante enteropatógeno, que carece de antígenos flagelares y capsulares, que son usados, por ejemplo, para la serotipificación de *E. coli*²⁷.

De acuerdo a la estructura del Ag O y a las pruebas bioquímicas, *Shigella* spp. se puede clasificar en especies o serogrupos: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*, cada una de ellas con múltiples serotipos, con excepción de *S. sonnei*.

- Serogrupo A o *S. dysenteriae*: incluye 15 serotipos (*S. dysenteriae* 1 al 15).
- Serogrupo B o *S. flexneri*: incluye 8 serotipos (*S. flexneri* 1 al 6, *S. flexneri* X y *S. flexneri* Y). A su vez, los serotipos 1 al 5, se dividen en



11 subserotipos, de acuerdo a diferentes combinaciones antigénicas de factores grupales, denominados (3)4, 6 y 7(8).

- Serogrupo C o *S. boydii*: incluye 20 serotipos (*S. boydii* 1 al 20).
- Serogrupo D o *S. sonnei*: contiene un único serotipo que se puede presentar en dos formas, la forma I (lisa) y la forma II (rugosa).

Los serogrupos A y C se encuentran con muy poca frecuencia en nuestro medio.

Serotipificación somática

La serotipificación, se debe realizar de acuerdo a las especificaciones dadas por el productor de los antisueros diagnósticos que se empleen.

La determinación del Ag Ode *Shigella* spp., se realiza por aglutinación en lámina, a partir de un cultivo en agar TSA, incubado a 37 °C, durante 18 a 24 h.

Siempre se debe verificar que el cultivo se encuentre en forma lisa, es decir que no aglutine con solución fisiológica. Una porción del cultivo se mezcla con solución fisiológica, con un ansa o un palillo, y se rota suavemente la lámina durante 1 min. Luego se observa la presencia o ausencia de grumos:

- Si hay grumos la cepa está rugosa y no se puede realizar la serotipificación somática (O). Para revertir la rugosidad, se realizan subcultivos en agar sangre o agar Mueller Hinton, de manera de recuperar la forma lisa y poder continuar con la serotipificación somática.
- Si no presenta grumos se realiza la serotipificación somática (O), con antisueros polivalentes para los serogrupos como se indica a continuación:



- En una lámina de vidrio se enfrenta una suspensión del cultivo en solución fisiológica, en primer lugar con antisueros somáticos polivalentes para los serogrupos más frecuentes (B y D),.
- De no haber aglutinación, con ninguno de los dos, se continúa probando los polivalentes correspondientes a los serogrupos A y C.
- Si hay aglutinación con alguno de los antisueros polivalentes, en el caso de los serogrupos A, B y C, se prueban los antisueros monovalentes para determinar los serotipos.
- Las reacciones de aglutinación se deben leer, dentro de un período de un minuto. Aquellas reacciones débiles o que ocurren después del minuto, deben ser consideradas inespecíficas.

Se deben tener en cuenta las consideraciones que se detallan en el siguiente cuadro:

Consideraciones a tener en cuenta:

a) Si el cultivo en estudio no reacciona con ninguno de los antisueros polivalentes O probados o lo hace débilmente y bioquímicamente pertenece al género *Shigella*, puede tratarse de una cepa que posea un antígeno de envoltura, que inhibe la aglutinación del Ag O. Como los antígenos de envoltura son termolábiles, se hace una suspensión bacteriana en solución fisiológica y se hierve en agua, durante 15 a 30 min, para remover este antígeno. Se enfría y se prueba con solución fisiológica para determinar si la cepa está rugosa. Si la suspensión calentada no está rugosa, se prueba nuevamente con los antisueros O polivalentes.

b) Si un aislamiento reacciona con alguno de los antisueros polivalentes O, pero no lo hace con los antisueros correspondiente a los respectivos serotipos, sobre todo con los correspondientes al sergrupo B, puede tratarse de una cepa no



comprendida en dichos antisueros, en tal caso se debe remitir la misma al Laboratorio de Referencia.

Métodos moleculares

El gen *ipaH* codifica una proteína involucrada en el proceso de invasión a las células epiteliales y está presente en múltiples copias en el plásmido de 140 MDa de *Shigella* spp. y en el cromosoma. Esta secuencia ha sido propuesta por diferentes autores para la identificación de *Shigella*, aunque debe considerarse que también está presente en los aislamientos de EIEC^{19, 48}. Por lo tanto, se propone la amplificación por PCR de este gen para la detección preliminar de *Shigella* spp./EIEC, que deberá ser luego complementada con pruebas bioquímicas y de serotipificación, a fin de diferenciar a este microorganismo de EIEC. Recientemente, van den Beld y Reubsaet propusieron un flujograma para la diferenciación de *Shigella* spp./EIEC entre sí y con respecto a *E. coli* no enteroinvasivo⁴⁸. El esquema propone la detección del gen *ipaH* por PCR, observación de movilidad y como pruebas adicionales la fermentación de salicina, hidrólisis de esculina, producción de indol, gas en la fermentación de glucosa y serotipificación.

El protocolo de PCR descrito por Hartman y col. consiste en la amplificación de un fragmento de 619 pb del gen *ipaH* y puede aplicarse para confirmar la identificación de aislamientos con características compatibles con *Shigella* spp./EIEC. Otros autores han descrito protocolos de PCR para la identificación directa de *Shigella* spp./EIEC a partir de muestras de materia fecal⁷, también basados en la detección del gen *ipaH*. Esta reacción es de



especial valor para muestras negativas por cultivo, que suelen presentarse debido a limitaciones en la recuperación de estos patógenos o en pacientes que han recibido tratamiento antibiótico.

También se propuso la detección de *ipaH* en ensayos de PCR en tiempo real para identificación de *Shigella* spp./EIEC en muestras de alimentos y/o materia fecal²⁹.

Subtipificación molecular

La incorporación de técnicas de subtipificación molecular para determinar la relación genética entre aislamientos de *Shigella* spp. ha significado un aporte importante para la vigilancia epidemiológica, la identificación y el estudio de brotes causados por este microorganismo^{16, 21, 23, 37}.

Entre las técnicas aplicadas se destaca la electroforesis en campo pulsado (PFGE), utilizada en el marco de la red internacional Pulse Net⁴⁷. Los protocolos estandarizados en esta red permiten la comparación de resultados para determinar la relación de aislamientos de *S. sonnei*⁴¹, aplicable además a otros serogrupos de *Shigella*³⁷. La técnica de PFGE se basa en el análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción generados a partir de la digestión del ADN genómico con enzimas de restricción de corte poco frecuente³⁶. Brevemente, el ADN blanco sin cortar se obtiene de embeber el microorganismo intacto en moldes de agarosa y luego se lisa enzimáticamente la pared celular y se digieren las proteínas celulares; posteriormente, el genoma aislado es digerido *in situ* con enzimas de restricción que tienen sitios



de reconocimiento poco frecuentes en el ADN en estudio. Después de la digestión se realiza la electroforesis en un gel de agarosa, aplicando campos de electricidad en direcciones alternadas, de manera de separar los fragmentos de ADN obtenidos, cuyo tamaño varía entre 10 y 800 Kb. El gel se tiñe a continuación con bromuro de etidio, se visualiza en un transiluminador con luz UV y se registra fotográficamente para su posterior análisis. El resultado de aplicar PFGE al ADN en cuestión provee un patrón de restricción cromosómico con excelente resolución, generalmente compuesto de 5 a 20 fragmentos diferentes.

Este protocolo ha sido aplicado para la vigilancia y el estudio de numerosos brotes en nuestro país y en la región de América Latina^{18, 38}.

Otra metodología desarrollada recientemente para la subtipificación de *Shigella* spp. es el *Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis* (MLVA), que se basa en el polimorfismo de determinadas secuencias que se encuentran repetidas en tandem dentro del genoma y varían en tamaño, número de copias y distribución en diferentes aislamientos. Esta técnica ha sido aplicada para estudios de diversidad genética de *S. sonnei*¹⁴. También se evaluó para *S. flexneri*, pero debido a la diversidad entre los serotipos de esta especie, no es posible disponer de un protocolo único que resulte discriminatorio para todos los serotipos⁵².



Bibliografia

1. Al-Hasani K, Henderson IR, Sakellaris H, Rajakumar K, Grant T, Nataro JP, Robins-Browne R, Adler B. The *sigA* gene which is borne on the *she* pathogenicity island of *Shigella flexneri* 2a encodes an exported cytopathic protease involved in intestinal fluid accumulation. *Infect Immun*. 2000; 68: 2457–63.
2. Brenner DJ, Steigerwalt AG, Wathen HG, Gross RJ, Rowe B. Confirmation of aerogenic strains of *Shigella boydii* 13 and further study of *Shigella* serotypes by DNA relatedness. *J Clin Microbiol*. 1982; 16: 432–6.
3. Buchrieser C, Glaser P, Rusniok C, Nedjari H, D'Hauteville H, Kunst F, Sansonetti P, Parsot C. The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins secreted by the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol*. 2000; 38: 760–71.
4. Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta, USA. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. Shigellosis.
<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/shigellosis>.
5. Christensen H, Nordentoft S, Elmerdahl, Olsen J. Phylogenetic relationships of *Salmonella* based on rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol*. 1988; 48: 605–10.
6. DuPont HL, Levine M, Hornick RB, Formal SB. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *J Infect Dis*. 1989; 159: 1126–8.
7. Dutta S, Chatterjee A, Dutta P, Rajendran K, Roy S, Pramanik KC, Bhattacharya SK. Sensitivity and performance characteristics of a direct PCR with stool samples in comparison to conventional techniques for diagnosis of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infection in children with acute diarrhoea in Calcutta, India. *J Med Microbiol*. 2001; 50: 667-74.



8. Ewing WH. *Shigella* nomenclature. J Bacteriol. 1949; 57: 633–8.
9. Ewing, W. The genus *Shigella*. En: Edwards and Ewing, editors. Identification of *Enterobacteriaceae*, 4th edition. New York, USA, Elsevier Science Publishers, 1986.
10. Faruque SM, Chowdhury N, Khan R, Hasan MR, Nahar J, Islam MJ, Yamasaki S, Ghosh AN, Nair GB, Sack DA. *Shigella dysenteriae* type 1-specific bacteriophage from environmental waters in Bangladesh. Appl Environ Microbiol. 2003; 69: 7028–31.
11. Fasano A, Noriega FR, Liao FM, Wang W, Levine MM. Effect of *Shigella* enterotoxin 1 (ShET1) on rabbit intestine in vitro and in vivo. Gut. 1997; 40: 505–11.
12. Fasano A, Noriega FR, Maneval DR Jr, Chanasongcram S, Russell R, Guandalini S, Levine MM. *Shigella* enterotoxin 1: an enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a active in rabbit small intestine in vivo and in vitro. J Clin Invest. 1995; 95: 2853–61.
13. Filliol-Toutain I, Chiou CS, Mammina C, Gerner-Smidt P, Thong KL, Phung DC, Pichel M, Ranjbar R, Sow AG, Cooper K, Ribot E, Binsztein N, Liang SY. Global distribution of *Shigella sonnei* clones. Emerg Infect Dis. 2011; 17: 1910-2.
14. Gorden J, Small PL. Acid resistance in enteric bacteria. Infect Immun. 1993; 61: 364–7.
15. Gutiérrez Garitano I, Naranjo M, Forier A, Hendriks R, DE Schrijver K, Bertrand S, Dierick K, Robesyn E, Quoilin S. Shigellosis outbreak linked to canteen-food consumption in a public institution: a matched case-control study. Epidemiol Infect. 2011; 139: 1956-64.
16. Hale TL. Genetic basis of virulence in *Shigella* species. Microbiol Rev. 1991; 55: 206–24.
17. Hamilton-West MC, Prado JV, Hormazábal JC, Lagos ZR, Benadof FD, Mendoza N, Elgueta NA, Tapia PC, C Fuentes DM, Alvarez AI, Hernández EM. *Shigella* spp. infections in children living in the Metropolitan Region, Chile, during summer of 2004-2005. Rev Med Chil. 2007; 135: 1388-96.



18. Hartman A, Venkatesan M, Oaks E, Buysse J. Sequence and molecular characterization of a multicopy invasion plasmid antigen gene, *ipaH*, of *Shigella flexneri*. J Bacteriol. 1990; 172: 1905-15.
19. Islam D, Bandholtz L, Nilsson J, Wigzell H, Christensson B, Agerberth B, Gudmundsson G. Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. Nat Med. 2001; 7:180–5.
20. Islam MA, Huq M, Nabi A, Talukdar PK, Ahmed D, Talukder KA Cravioto A, Endtz HP. Occurrence and characterization of multidrug-resistant New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing bacteria isolated between 2003 and 2010 in Bangladesh. J Med Microbiol. 2013; 62: 62-8.
21. Jin Q, Yuan Z, Xu J, Wang Y, Shen Y, Lu W, Wang J, Liu H, Yang J, Yang F, Zhang X, Zhang J, Yang G, Wu H, Qu D, Dong J, Sun L, Xue Y, Zhao A, Gao Y, Zhu J, Kan B, Ding K, Chen S, Cheng H, Yao Z, He B, Chen R, Ma D, Qiang B, Wen Y, Hou Y, Yu J. Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. Nucleic Acids Res. 2002; 30: 4432–41.
22. Koh XP, Chiou CS, Ajam N, Watanabe H, Ahmad N, Thong KL. Characterization of *Shigella sonnei* in Malaysia, an increasingly prevalent etiologic agent of local shigellosis cases. BMC Infect Dis. 2012; 12:122.
23. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, Wu Y, Sow SO, Sur D, Breiman RF, Faruque AS, Zaidi AK, Saha D, Alonso PL, Tamboura B, Sanogo D, Onwuchekwa U, Manna B, Ramamurthy T, Kanungo S, Ochieng JB, Omoro R, Oundo JO, Hossain A, Das SK, Ahmed S, Qureshi S, Quadri F, Adegbola RA, Antonio M, Hossain MJ, Akinsola A, Mandomando I, Nhampossa T, Acácio S, Biswas K, O'Reilly CE, Mintz ED, Berkeley LY, Muhsen K, Sommerfelt H, Robins-Browne RM, Levine MM. Burden and etiology of diarrhoeal disease in infants and young children in



- developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*. 2013; 382: 209-22.
24. Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, Adak GK, Levine MM. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull World Health Organ*. 1999; 77: 651-66.
 25. Lan R, Lumb B, Ryan D, Reeves PR. Molecular evolution of large virulence plasmid in *Shigella* clones and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2001; 69: 6303–9.
 26. Liu B, Knirel YA, Feng L, Perepelov AV, Senchenkova SN, Wang Q, Reeves PR, Wang L. Structure and genetics of *Shigella* O antigens. *FEMS Microbiol Rev*. 2008; 32: 627-53.
 27. Ministerio de Salud Presidencia de la Nación. Boletín Integrado de Vigilancia Secretaría de Promoción y Programas Sanitarios. N°128, 2012; p. 7-20.
 28. Mokhtari W, Nsaibia S, Gharbi A, Aouni M. Real-time PCR using SYBR Green for the detection of *Shigella* spp. in food and stool samples. *Mol Cell Probes*. 2013; 27: 53-9.
 29. Murray RGE, Brenner DJ, Colwell RR, De Vos P, Goodfellow M, Grimont PAD, Pfennig N, Stackebrandt E, Zivarzin GA. International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the *ad hoc* committee on approaches to taxonomy within the Proteobacteria. *Int J Syst Bacteriol*. 1990; 40:213–5.
 30. Ochman H, Whittam TS, Caugant DA, Selander RK. Enzyme polymorphism and genetic population structure in *Escherichia coli* and *Shigella*. *J Gen Microbiol*. 1983; 129: 2715–26.
 31. Ogawa M, Sasakawa C. Intracellular survival of *Shigella*. *Cell Microbiol*. 2006; 8: 177–84.
 32. Parsot C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiol Lett*. 2005; 252: 11–8.



33. Peng J, Zhang X, Yang J, Wang J, Yang E, Bin W Wei C, Sun M, Jin Q. The use of comparative genomic hybridization to characterize genome dynamics and diversity among the serotypes of *Shigella*. BMC Genomics. 2006; 7:218.
34. Pichel M, Binsztein N. Capítulo 6. Principios y aplicaciones de electroforesis en campo pulsado (PFGE). En: Merino LA, Giusiano G, editores. Manual de métodos moleculares para estudios microbiológicos. Buenos Aires, Asociación Argentina de Microbiología, 2011, p. 27-8.
35. Pichel M, Brengi SP, Cooper KLF, Ribot EM, Al-Busaidy S, Araya P, Fernández J, Vaz TI, Kam KM, Morcos M, Nielsen EM, Nadon C, Pimentel G, Pérez-Gutiérrez E, Gerner-Smidt P, Binsztein N, *Shigella flexneri* PulseNet PFGE Protocol Working Group. Standardization and international multicenter validation of a PulseNet pulsed field gel electrophoresis protocol for subtyping *Shigella flexneri* isolates. Foodborne Pathog Dis. 2012; 9: 418-24.
36. Pichel M, González Fraga S, Terragno R, Mulki J, Gentile A, Kremer C, Mola AM, Nosedá R, Binsztein N. Analysis of clonal relationship among *Shigella sonnei* isolates circulating in Argentina. Epidemiol Infect. 2007; 26:681-7.
37. Pupo GM, Karaolis DKR, Lan R, Reeves PR. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. Infect Immun. 1997; 65: 2685–92.
38. Pupo GM, Lan R, Reeves PR. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97: 10567–72.
39. Ribot EM, Fair MA, Gautam R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathog Dis. 2006; 3:59-67.



40. Sansonetti PJ, Hale TL, Dammin GJ, Kapfer C, Collins HH, Formal SB. Alterations in the pathogenicity of *Escherichia coli* K-12 after transfer of plasmid and chromosomal genes from *Shigella flexneri*. Infect Immun. 1983; 39:1392–402.
41. Sansonetti PJ, Kopecko DJ, Formal SB. Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. Infect Immun. 1982; 35: 852–60.
42. Schroeder GN, Hilbi H. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp. controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. Clin Microbiol Rev. 2008; 21: 134-56.
43. Stelling J, Yih WK, Galas M, Kulldorff M, Pichel M, Terragno R, Tuduri E, Espetxe S, Binsztein N, O'Brien TF, Platt R; Collaborative Group WHONET-Argentina. Automated use of WHONET and SaTScan to detect outbreaks of *Shigella* spp. using antimicrobial resistance phenotypes. Epidemiol Infect. 2010; 138: 873-83.
44. Nie H1, Yang F, Zhang X, Yang J, Chen L, Wang J, Xiong Z, Peng J, Sun L, Dong J, Xue Y, Xu X, Chen S, Yao Z, Shen Y, Jin Q. Complete genome sequence of *Shigella flexneri* 5b and comparison with *Shigella flexneri* 2a. BMC Genomics. 2006; 7: 173.
45. Swaminathan B, Barrett T, Hunter S, Tauxe R, CDC PulseNet Task Force. PulseNet: The molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. Emerg Infect Dis. 2001; 7:382-9.
46. Talukder KA and Azmi IJ. Population genetics and molecular epidemiology of *Shigella* species. En: Faruque SM, editor. Foodborne and waterborne bacterial pathogens. Epidemiology, evolution and molecular biology. Norfolk, England, Caister Academic Press, 2012, p. 63-76.
47. van den Beld MJC, Reubsaet FAG. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012; 31: 899–904.
48. Venkatesan MM, Goldberg MB, Rose DJ, Grotbeck EJ, Burland V, Blattner FR. Complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Shigella flexneri*. Infect Immun. 2001; 69: 3271-85.



49. Wang JD, Xue Y, Xu X, Zhu Y, Chen S, and Jin Q. The complete sequence and analysis of the large virulence plasmid pSS of *Shigella sonnei*. *Plasmid*. 2005; 54: 149–59.
50. Wang YW, Watanabe H, Phung DC, Tung SK, Lee YS, Terajima J, Liang SY, Chiou CS. Multilocus variable-number tandem repeat analysis for molecular typing and phylogenetic analysis of *Shigella flexneri*. *BMC Microbiol*. 2009; 9: 278.
51. Weissman JB, Gangorosa EJ, Schmerler A, Marier RL, Lewis JN. Shigellosis in day-care centres. *Lancet*. 1975; 1: 88–90.
52. WHO Regional Office for South East Asia. Blood safety and clinical technology. Guidelines on standard operating procedures for microbiology. Cap. 14-dysentery. http://209.61.208.233/en/Section10/Section17/Section53/Section482_1796.htm
53. Yang F, Yang J, Zhang X, Chen L, Jiang Y, Yan J, Tang X, Wang J, Xiong Z, Dong J, Xue Y, Zhu Y, Xu X, Sun L, Chen S, Nie H, Peng J, Xu J, Wang Y, Yuan Z, Wen Y, Yao Z, Shen Y, Qiang B, Hou Y, Yu J, Jin Q. Genome dynamics and diversity of *Shigella* species, the etiologic agents of bacillary dysentery. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33:6445–58.



Parte II.c.1
ENTEROBACTERIAS

Capítulo II.c.1.3
Klebsiella, Enterobacter, Pantoea, Cronobacter,
Raoultella, Serratia

SUSANA MARÍA PÉREZ

Ex Directora del Departamento de Microbiología
de IACA Laboratorios, Bahía Blanca

EDGARDO RAUL STREITENBERGER

Jefe del Departamento de Biología Molecular
de IACA Laboratorios, Bahía Blanca



Enterobacterias del grupo KES (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*)

El grupo KES estuvo conformado originariamente por los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*. La tipificación molecular basada en el análisis de ADN trajo aparejado cambios significativos con la asignación de nuevos géneros y especies y reubicación de especies existentes.

Los integrantes del grupo KES reflejan claramente los cambios y su clasificación taxonómica es objeto de permanente revisión.

Hasta 2012 habían surgido tres nuevos géneros: *Cronobacter*, *Pantoea* y *Raoultella*. El cambio de mayor importancia clínica fue el movimiento de *Enterobacter sakazakii* al nuevo género *Cronobacter*, en el que se definieron seis especies adicionales y una genomoespecie^{68,153}.

La clasificación taxonómica de las especies del género *Enterobacter* sigue aún en revisión. Evidencia de ello son las publicaciones de Brady en 2013 y Stephan en 2014^{14, 138}.



El género *Pantoea* fue creado en 1989. Su especie tipo, *P. agglomerans*, estuvo ubicada hasta ese momento en el género *Enterobacter*⁵⁰. El nombre *Pantoea* proviene del idioma griego “de todos los tipos y fuentes”, aludiendo a su origen ubicuo (medio ambiente, seres humanos). Contiene siete especies publicadas que son principalmente fitopatógenas pero algunas de ellas se han relacionado con infecciones humanas^{27, 29, 127}.

Cronobacter sakazakii, contaminante ocasional de las fórmulas lácteas infantiles, es causa reconocida de enfermedades en los lactantes y en niños de hasta tres años de edad, con tasas de mortalidad relativamente altas en los recién nacidos. En 2004 la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), lo han clasificado, junto a *Salmonella enterica*, como microorganismos de categoría “A”, es decir, reconocido como un peligro grave para la población.

Actualmente las pruebas bioquímicas disponibles tienen bajo poder de discriminación para identificar correctamente las especies de *Cronobacter*.

El género *Raoultella*, surge como reclasificación de tres especies ambientales anteriormente incluidas dentro del género *Klebsiella*³³.

En el género *Serratia*, *Serratia marcescens*, considerada en el pasado como no patógena, es en la actualidad, reconocida como agente responsable de infecciones nosocomiales y de pacientes de la comunidad. Las restantes especies pueden comportarse como patógenos oportunistas a excepción de *Serratia entomophila*.

Estos géneros, como integrantes de la familia *Enterobacteriaceae*, están ampliamente distribuidos en el medio ambiente como se observa en la Tabla 1.



No todas las especies citadas en la misma se han aislado de muestras clínicas humanas o no se aislaron en forma significativa.

Las especies aisladas exclusivamente de los insectos, plantas, peces, animales marinos o aves no se tratan en el texto de este capítulo. La información sobre ellos puede encontrarse en la bibliografía⁷⁰.

Pantoea agglomerans, *Serratia marcescens* y *Serratia* spp. tienen aplicaciones en biotecnología como rizobacterias, promoviendo el crecimiento de especies vegetales y como agentes de biocontrol para una variedad de enfermedades bacterianas y fúngicas de plantas (*S. entomophila*).

Tabla 1. Nomenclatura, fuente de aislamiento e importancia de los géneros *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Raoultella* y *Serratia*

Denominación actual	Datos clínicos			Datos ambientales
	Frec.	Fuente	Sign.	
Cronobacter				
C.dublinensis subsp. dublinensis, lausannensis y lactaridi	*	Herida,ojos, sangre	1	Alimentos y medio ambiente
C. malonaticus	+	Sangre, heridas,TR, oídos		Alimentos y medio ambiente
C.muytjensii	+	Médula osea, sangre	1	Alimentos y medio ambiente
C sakazakii	+++	RT, heridas, LCR,sangre	1	Fórmulas alimentarias, plantas
C.turicensis	+	Sangre	1	Alimentos y medio ambiente
Enterobacter				
E. aerogenes	++++	Todos los sitios	1	Ubicuo
E. amnigenus	-	TR, heces,		Plantas , agua
biogrupos 1 y 2				
E. asburiae	++	UT,RT, heces, heridas, sangre	2	Agua
E. cancerogenous	++	Heridas,TR, heces	2	Animales, agua
E. cloacae subsp. cloacae	++++	Todos los sitios	1	Agua, suelo, carne, aguas residuales
E. cloacae subsp. dissolvens	-			Enfermedad del maíz
E. cowanii	Desc	TR,TU, sangre, heridas	3	Desconocido
E. gergoviae	++	TR,TU, sangre	2	Agua, cosméticos
E. hormaechei subsp. hormaechei	++	TR, heridas, sangre	1	Aislado en ranas



<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i> y subsp. <i>steigerwaltii</i>	++	Todos los sitios	1	Plantas
<i>E. intermedius</i>				Agua y tierra
<i>E. kobei</i>	+	TR, TU, sangre	2	Alimentos
<i>E. ludwigii</i>	Desc	TU, TR, sangre heces	2	Alimentos
<i>E. nimipressuralis</i>	—			Olmos, arroz salvaje
<i>E. pyrinus</i> / <i>E. pulveris</i>	—			Fruta, leche en polvo, perales
<i>E. radicincitans</i>	—			Filósfera de trigo de invierno
<i>E. helveticus</i>	—			Polvo de la fruta
Klebsiella				
<i>K. granulomatis</i>	++	Tracto genital	1	Ninguno. Restringido al hombre
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	++++	Todos los sitios TR/TU más común	1	Ubicua
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	++	Secreción nasal TR, TU, sangre	1	Metritis en yeguas. Restringido al hombre
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>	++	Secreción nasal	2	Ninguno. Restringido al hombre
Denominación actual	Datos clínicos			Datos ambientales
	Frec.	Fuente	Sign.	
<i>K. oxytoca</i>	+++	Todos los sitios. Común en heces	2	Ubicua
<i>K. singaporensis</i>	—			Suelo
<i>K. variicola</i>	++	Sangre. orina	1	Plantas
Pantoea				
<i>Pantoea agglomerans</i>	+++	Todos los sitios	2	Plantas, agua, animales
Raoultella				
<i>R. planticola</i> ,	Desc.		3	Plantas, agua
<i>R. terrigena</i>	Desc.		3	Plantas, agua, suelo
<i>R. ornithinolytica</i>	+	Heridas, TU, sangre	2	Alimentos
Serratia				
<i>S. entomophila</i>	-			Patógeno de insectos
<i>S. ficaria</i> ,	+	TR, heridas	3	Higueras, otras plantas e insectos
<i>S. fonticola</i>	+	Heridas, TR	3	Aves acuáticas, agua, suelo
<i>S. grupo liquefaciens</i>	+++	TR, heridas	2	Ubicuo
<i>S. marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	++++	Todos los sitios, más común TR	1	Ubicuo
<i>S. marcescens</i> biogrupo 1	+	TU; TR	2	Desconocido
<i>S. marcescens</i> subsp. <i>sakuensis</i>	-			Aguas residuales
<i>S. odorifera</i> biogrupos 1 y 2	+	TR, heridas, heces	2	Plantas, animales, alimentos
<i>S. plymuthica</i>	+	TR		Agua, plantas, mamíferos peq.
<i>S. rubidaea</i>	+	TR, heridas, sangre, TU, heces		Agua, plantas (cocos)
<i>S. ureilytica</i>	-			Nematodos , agua
<i>S. nematodiphila</i>	-			Nematodos , agua
<i>S. proteomaculans</i> subsp. <i>quinivorans</i>	-			Roedores salvajes, insectos, agua



Frec: frecuencia:++++ frecuente,+++ ocasional,++ raro,+ muy raro, - todavía noha sido aislado en humanos, TR tracto respiratorio, TU tracto urinario, Desc.: Desconocido.

Sign: significado clínico: 1. principales especies patógenas de humanos, 2. causa probada de la enfermedad en casos raros, 3. aislamientos en humanos de significado desconocido.

Datos tomados de las siguientes citas: 10,16, 54,55,56,61,63,68,71, 73, 89,128,140,141,151 y 159

K. pneumoniae, *Enterobacter* spp. y *K. oxytoca* se ubican entre los diez principales microorganismos asociados a infecciones nosocomiales^{59, 82,107}.

Los datos de vigilancia y los informes de casos de brotes América del Norte, Europa y Asia indican que *Enterobacter* spp. representa un importante patógeno oportunista entre los recién nacidos y pacientes debilitados en la unidades de cuidados intensivos (UCI). De acuerdo con los datos difundidos por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades Infecciosas de los Estados Unidos (CDC) en los últimos años el porcentaje de cepas resistentes no cambió sustancialmente. No obstante, es de público conocimiento que hay una emergencia mundial de bacilos gram negativos multirresistentes^{59, 74,135}.

Características generales

Morfológicamente los microorganismos pertenecientes a estos géneros son cocobacilos o bacilos de bordes redondeados cuyas dimensiones varían desde 0,3 a 1 µm de ancho y 3 a 6 µm de largo, son aerobios o anaerobios facultativos y en la coloración de Gram se comportan como gram negativos. Solo *Klebsiella* spp. y *Raoultella* spp. poseen cápsula.

No tienen exigencias nutricionales. La mayoría crece en los medios empleados para la siembra primaria de muestras clínicas: agar CLDE, agar eosina azul de metileno (Levine o EMB), medios cromogénicos, agar sangre,



etc., entre 25°C y 37°C, excepto algunas cepas de *Serratia plymuthica* que no lo hacen a 37°C. Las características culturales de la colonia variarán de acuerdo al medio empleado.

Los medios cromogénicos contienen sustratos para la detección de β -glucosidasa, enzima presente en los microorganismos del grupo KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter*), que permite diferenciarlos de *Escherichia coli*. El uso de estos medios orienta hacia las pruebas a seleccionar para la identificación final.

Varias especies producen pigmento rojo: algunas cepas de *Serratia marcescens*, *S. rubidaea* y *S. plymuthica* producen prodigiosina, pigmento que puede observarse en el centro, en los bordes o en toda la colonia.

Un pigmento amarillo es producido por especies ambientales *E. pulveris* y *E. turicensis*, la mayoría de las cepas de *Cronobacter sakazakii* y *P. agglomerans*^{139,140}.

Serratia odorifera produce un olor acre, por la producción de alquil-methoxypyrazinas⁵⁵.

Fermentan la glucosa, producen gas, son oxidasa negativas y catalasa positivas, reducen nitratos y nitritos. Son generalmente móviles, excepto el género *Klebsiella*.

La identificación inicial se basa en las características fenotípicas con el empleo de métodos convencionales y de costos más accesibles. La complejidad taxonómica de estos microorganismos y el hecho de que varias especies compartan un mismo perfil bioquímico hace que en determinados aislamientos se deba recurrir a los métodos moleculares para arribar a una identificación final.



Un esquema de pruebas bioquímicas iniciales para estudiar un bacilo gram negativo que presumimos se trata de una enterobacteria, puede estar constituido por las siguientes determinaciones: TSI (agar con hierro y triple azúcar), ONPG (o-nitrofenilgalactopiranosido), SIM (sulfhídrico, indol, motilidad), Citrato, MR/VP (rojo de metilo/ Voges Proskauer), LDC (lisina descarboxilasa), ODC (ornitina descarboxilasa) y urea de Christensen (ver Apéndice).

Los caracteres diferenciales de *Enterobacter* spp. más frecuentes y géneros relacionados se observan en la Tabla 2.

Tabla 2. Caracteres diferenciales de especies de *Enterobacter* más frecuentes y géneros relacionados

Reacciones	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Serratia marcescens</i>
Glucosa (gas)	+	+	V	+	+
Lactosa 24 h.	+	+	V	+	-
Movilidad	+	+	+	-	+
Urea	V	-	-	+	-
Indol	-	-	-	-	-
VP ^a	+	+	V	+	+
ONPG	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	V	+	+
DNasa (25°C)	-	-	-	-	+
LDC ^b	-	+	-	+	+
ODC ^c	+	+	-	+	+
ADH ^d	+	-	-	-	-
SBL ^e /RAF ^f	+	+	V	+	+



Pigmento	-	-	V (80%) ^g	-	V ^h
----------	---	---	----------------------	---	----------------

+, ≥90%; V, de 11 a 89 %; -, ≤ 10%

^aVP: Voges-Proskauer, ^bLDC: lisina descarboxilasa, ^c ODC: ornitina descarboxilasa, ^d ADH: arginina dihidrolasa, ^e SBL: sorbitol, ^f RAF: rafinosa, ^g pigmento amarillo, ^h pigmento rojo

C. sakasakii semejante a *E. cloacae* pero con pigmento amarillo y sorbitol negativo

E. gergoviae semejante a *E. aerogenes* pero ureasa positivo y sorbitol negativo

Sensibilidad a los antibióticos

Las cepas salvajes de *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. y *Serratia* spp. poseen resistencia natural a diferentes antimicrobianos como se muestra en la Tabla 3.

Su conocimiento es empleado como indicador de género y especie (Tabla 4).

Tabla 3. Resistencia natural de los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*

	Ampicilina	Ampicilina/ sulbactama	Cefalotina	Cefoxitina	Nitrofuranos	Colistina
<i>K. pneumoniae</i>	R					
<i>K. oxytoca</i>						
<i>E. hermannii</i>						
<i>E. cloacae</i>	R	R	R	R		
<i>E. aerogenes</i>						
<i>S. marcescens</i>	R	R	R	V	R	R

R, resistente; V, variable.

Tabla 4. Diferenciación de los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia* en base a sus resistencias naturales

	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Serratia</i>
Cefoxitina	S	R	R/S
Colistina	S	S	R



Inducción ^a	Negativa	Positiva	Positiva
------------------------	----------	----------	----------

^aAchatamiento del halo de inhibición de cefotaxima o ceftazidima en la proximidad de los discos de cefoxitina o imipenem. R: resistente, S: sensible.

Pueden existir cepas de *Klebsiella* spp. resistentes a cefoxitina, fenotipo que se diferencia de *Enterobacter* spp. o *Serratia* spp. porque en *Klebsiella* se observa el fenómeno de achatamiento del halo de inhibición de las cefalosporinas de tercera generación en la proximidad de agentes inductores de la cefalosporinasa cromosómica propia de géneros como *Enterobacter* y *Serratia*.

Mientras el género *Serratia* es naturalmente resistente a la colistina, es excepcional observar este mecanismo en los aislamientos de *Enterobacter* y *Klebsiella*.

Además de la resistencia natural a determinados β -lactámicos, cada género tiene una capacidad potencial para adquirir nuevos mecanismos enzimáticos de resistencia a otros miembros de esta familia de antimicrobianos muy empleados en clínica^{59,135}.

El uso excesivo de antimicrobianos ha llevado a la aparición de cepas portadoras de carbapenemasas tipos KPC, metalo- β -lactamasas y de diversas cefalosporinasas, cepas multirresistentes para los que casi no existen opciones terapéuticas³⁷. Con frecuencia, los plásmidos que codifican estas enzimas también llevan genes de resistencia para los aminoglucósidos, quinolonas y otros antimicrobianos¹²⁰.



A la diseminación intercontinental de cepas portadoras de carbapenemasas tipo KPC se suma la aparición en 2010 de NMD (Nueva Delhi metalo β -lactamasa), de diseminación vertical y horizontal¹⁰⁶.

Si bien *K. pneumoniae* representa la amenaza más grave, también se ha informado portación de estas enzimas en aislamientos de *K. oxytoca*, *S.marcescens*, *Enterobacter* spp. y de otras enterobacterias¹⁰⁵.

Para el aislamiento selectivo e identificación presuntiva de cepas productoras de BLEE y de KPC se han desarrollado medios cromogénicos tales como CHROMagar KPC (CHROMagar), chromID ESBL(bioMérieux), CHROMagar ESBL (CHROMagar), Brilliance ESBL agar (Oxoid). Los mencionados han mostrado buena sensibilidad y especificidad^{40, 145}.

Métodos fenotípicos y genotípicos permiten la detección de BLEE, cefalosporinasas y carbapenemasas. Se han estandarizado estrategias metodológicas para detectar enzimas tipo KPC y demás carbapenemasas, de acuerdo al método empleado para la prueba de sensibilidad, ya sea manual, automatizado (Phoenix, Vitek 2C) o métodos con gradiente de antibióticos (ICE)^{114,116,117,119}.

Existen laboratorios de referencia y periféricos que conforman la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (ReLAVRA) <http://antimicrobianos.com.ar/category/resistencia/relavra>) y los centros pertenecientes a la red WHONET-Argentina (<http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2014/10/Protocolo-WHONET-consensuado-agosto-2014-FINAL-2.pdf>) que han elaborado recomendaciones para el informe de enterobacterias productoras de BLEE. Según estos documentos, al detectarse la producción de BLEE se debe

informar como resistentes a todas las penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación y aztreonam. Los carbapenemes, cefoxitina y las combinaciones de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas se deben informar sensibles o resistentes de acuerdo al resultado del antibiograma o según la CIM.

El laboratorio de microbiología debe conocer las características de cada especie, manejar las técnicas apropiadas para detectar los mecanismos de resistencia y estar actualizado en cuanto a los cambios operados en la resistencia ya sea a nivel local, nacional y mundial.

Datos argentinos y americanos relacionados con la problemática de la resistencia pueden consultarse en la literatura especializada^{20,51, 115, 118,125, 146}.

Género *Klebsiella*

Este género lleva su nombre en honor al microbiólogo alemán Theodor Albrecht Edwin Klebs, quien en 1875 observó la presencia de bacterias en muestras de exudados bronquiales de pacientes que habían fallecido por procesos neumónicos. En 1882, Friedländer aisló dichas bacterias investigando la etiología de la neumonía lobar. En 1887 Trevisan identificó al bacilo de Friedländer como *Klebsiella pneumoniae*. Con el paso de los años se pudo determinar que las neumonías causadas por *Klebsiella* spp. no se diferencian en su clínica de las originadas por otros microorganismos gram negativos.

Aspectos taxonómicos

Los criterios empleados para la clasificación de las especies del género *Klebsiella* fueron cambiando con el transcurrir del tiempo. La clasificación se basó primeramente en su origen y aspectos patogénicos, luego se apoyó en las características fenotípicas (actividad enzimática y utilización de sustratos) y a pesar de todos estos desarrollos, en ciertos casos persisten las dificultades para la correcta identificación taxonómica.

Los estudios moleculares basados en el análisis de secuencia del gen del ARN ribosomal 16S que son una herramienta de gran importancia en la clasificación bacteriana, en el caso del *Klebsiella* spp., tienen una utilidad limitada, ya que permiten buena resolución a nivel de género pero con limitada resolución a nivel de especie. El estudio de genes adicionales tales como el *rpoB* (subunidad β del la ARN polimerasa), *gyrB* (ADN girasa B), entre otros, ha permitido resolver los problemas existentes. La recomendación es realizar el análisis de secuencia de alrededor de cinco genes diferentes cuando se pretende clasificar una especie^{23,96}.

En la actualidad el género *Klebsiella* está constituido por las especies *K. pneumoniae* (principal patógeno), *K. oxytoca* y *K. granulomatis*. *K. pneumoniae* comprendetres subespecies: *K. pneumoniaesubsp. pneumoniae*, *K. pneumoniaesubsp. rhinoscleromatis*y*K. pneumoniae subsp. ozaenae*. Estas últimasoson no fermentadores y se asocian a enfermedades crónicas: el rinoescleroma y la rinitis atrófica crónica respectivamente^{15, 30,72}.

Otra especie, *K. variicola*, bioquímicamente muy cercana a *K. pneumoniae*, ha sido aislada especialmente de sitios estériles, principalmente sangre y orina^{3, 128}.

Tres especies ambientales antes consideradas dentro del género *Klebsiella*, han sido reclasificadas en el género *Raoultella*: *R. planticola*, *R. terrigena* y *R. ornithinolytica*³³.

Epidemiología, transmisión y significado clínico

El género *Klebsiella* está ampliamente distribuido en la naturaleza, es huésped habitual saprófito del hombre y de los animales y la especie *K. pneumoniae* forma parte de la microbiota normal del intestino humano y de la cavidad oral. Es así que las heces son la fuente más significativa de las infecciones.

En el medio ambiente se lo puede encontrar en aguas de consumo, aguas residuales, suelo, vegetales y animales.

Si bien se lo aísla como agente causal de infecciones del tracto urinario (ITU) y de neumonía, es fundamentalmente un patógeno oportunista y como tal una de las principales causas de infecciones nosocomiales³⁶.

Su capacidad de diseminación en las superficies mucosas del hospedero, sumada a la diversidad de expresión de los factores de virulencia, genera infección en diferentes sitios anatómicos y coloniza distintos nichos ecológicos.

En el ámbito hospitalario, tiende a propagarse rápidamente causando brotes por cepas multirresistentes, especialmente en las salas de neonatología

^{31,65}.

Se transmite por las gotitas de *pflüge* y las manos del personal. Ha sido aislado en crema de manos, soluciones endovenosas, equipos de ventilación, etc.

Estudios realizados muestran que el aumento de aislamientos de *Klebsiella* en sangre durante los meses de verano es 1,5 veces superior⁴, comportamiento no evidenciado en los géneros *Enterobacter* ni *Serratia*. Esto se correlaciona con una mayor tasa de transporte en heces y, por ende, una mayor diseminación en el ambiente. Este dato es importante por cuanto el paciente portador de *Klebsiella* tiene un riesgo cuatro veces superior de contraer infección frente al no portador.

K. pneumoniae se ha reportado en neumonías, bacteriemias, meningitis, infecciones del tracto urinario, enteritis graves¹, infecciones de tejidos blandos, uveítis anterior aguda, infecciones de las vías biliares, abscesos hepáticos, peritonitis^{19,41} e infecciones en heridas. También se ha aislado a partir de infecciones por dispositivos invasivos, especialmente en pacientes debilitados por enfermedades subyacentes y ocupa el segundo lugar como causa de bacteriemia por gram negativos, solo después de *E. coli*^{22,92}.

En los últimos veinte años *K. pneumoniae*, se ha reportado con poca frecuencia como causa de neumonía adquirida en la comunidad (NAC) en América del Norte, Australia y Europa pero sigue siendo la primera causa bacteriana de NAC en adultos taiwaneses¹⁵⁸. Debido a un aumento en los casos de meningitis secundaria a absceso hepático primario, esta especie ha reemplazado a *Streptococcus pneumoniae* como el patógeno principal de meningitis bacteriana de la comunidad en adultos en Taiwán⁹³. En 1986 se describió también en Taiwán por primera vez una cepa hipervirulenta de

K.pneumoniae en personas inmunocompetentes de la comunidad. Esta bacteria fue capaz de producir absceso hepático primario, neumonía, meningitis y endoftalmitis y demostró una gran capacidad de propagarse metastásicamente desde el foco primario de infección. También se la ha encontrado en países occidentales aunque con menor frecuencia que en Asia. La mayor incidencia de absceso hepático primario por *Klebsiella* se da en hombres asiáticos, entre 50 y 60 años de edad, se presentan principalmente en el lóbulo derecho, como un absceso solitario y monomicrobiano^{42, 75, 86,126, 128}.

Como agente causal de infección de vías urinarias se observa especialmente en pacientes con alteraciones anatómicas, posteriores a cirugía, obstruidos, sondados y en niños y adultos con enfermedades crónicas. *Klebsiella* spp. se ha aislado de pacientes con infecciones del oído medio, mastoiditis, infecciones de senos óseos, odontológicas, oftalmológicas y con menor frecuencia en fascitis necrotizante y absceso prostático^{7, 32,122, 131}.

K. oxytoca (segunda especie en frecuencia de aislamientos) y *K. pneumoniae* se detectaron como patógenos intestinales, especialmente en pacientes menores de 6 años de edad^{1,95} y son una importante causa de brotes en unidades de cuidados intensivos neonatales^{5, 65}. *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* y *Klebsiella pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* producen lesiones nasales que, aunque infrecuentes, se identifican como causa de enfermedad en los países tropicales.

Klebsiella pneumoniae subsp. *ozaenae* no suele ser patógeno y sólo excepcionalmente produce infecciones en el ser humano. En cuadros de rinitis atrófica crónica puede desarrollar infección, si bien sólo desempeñaría el papel

de contaminante u oportunista que invade una mucosa previamente lesionada. Esta bacteria es sensible a las cefalosporinas, aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol y, a diferencia de *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, también a la ampicilina y a carbenicilina.

Klebsiella pneumoniae subsp. *rhinoscleromatis* es reconocida como agente causal del rinoscleroma, que es una inflamación granulomatosa crónica de la mucosa nasal, senos paranasales, faringe, laringe y oído medio. La biopsia evidencia células espumosas con bacilos gram negativos en su interior que se denominan células de Mikulicz y son patognomónicas. Esta enfermedad ocurre en zonas tropicales de Europa oriental, Asia, América Central y del Sur. Se presenta como casos esporádicos, es poco contagiosa y requiere de un contacto muy prolongado. Suele afectar a varios miembros de una misma familia. Los tejidos lesionados no se recuperan y a veces es necesario recurrir a su extirpación^{30,45}.

K. variicola ha sido aislada especialmente de sitios estériles, principalmente sangre y orina y su identificación debe ser confirmada por secuenciación del gen *rpoB*^{3, 129}.

K. granulomatis es agente causal del granuloma inguinal o donovanosis, enfermedad crónica, indolente, caracterizada por úlceras genitales y endémica en países tropicales^{9, 108, 149}.

Se considera que el hombre es el único receptor, se transmite sexualmente y es posible el contagio de madre a niño a través del canal del parto.

Las especies del género *Raoultella* son poco frecuentes en muestras clínicas. Principalmente se han aislado en infecciones del tracto urinario y

heridas. *Raoultella* spp. al igual que *Klebsiella* posee cápsula. *R. planticola* y *R. terrigena* comparten con *K. pneumoniae* características de patogenicidad y son difíciles de distinguir bioquímicamente sin efectuar pruebas especiales³.

Aspectos patogénicos

Los factores de virulencia identificados en *K. pneumoniae* son: el lipopolisacárido de la superficie celular (LPS) que contiene el antígeno O, el polisacárido capsular (CPS) que contiene el antígeno K, las adhesinas fimbriales y no fimbriales, la producción de aerobactina, el fenotipo mucóide y la resistencia a la actividad bactericida del suero. También se ha descrito la producción de citotoxinas, enterotoxinas y hemolisinas, con menor relevancia.

La cápsula polisacárida es el factor de virulencia más importante que protege a la bacteria de la fagocitosis por parte de los polimorfonucleares y previene su muerte por los factores séricos^{18,132}. Se ha observado que las cepas carentes de cápsula son menos patógenas que las que sí la poseen^{76,85}.

Existen fuertes asociaciones entre los 77 serotipos K y los 9 serotipos O. Por ejemplo, K1 y K2 casi siempre coexisten con O1, y K3 con O2.

De los serotipos capsulares solo K1, K2, K4 y K5 se reconocen como los más virulentos. Los serotipos K2, K4 y K5 se asocian con la neumonía adquirida en la comunidad.

Todas las cepas de *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* son de tipo capsular 3 (K3) mientras que las cepas de *K. pneumoniae* subsp. *ozaena* son principalmente de tipo K4 y rara vez de tipo K5^{15,45}.

Brisse y colaboradores, en base a la caracterización genómica y fenotípica de 235 cepas de *K. pneumoniae* de origen clínico y ambiental, determinaron la existencia de importantes clones virulentos del tipo capsular K1, asociados con infecciones específicas. El clon CC23K1 ha sido asociado fuertemente con absceso hepático primario y el complejo clonal CC82K1 con infecciones respiratorias y del torrente sanguíneo¹⁵.

En la adherencia de *Klebsiella* spp. a las células del hospedero intervienen los *pili*, con predominio de los tipos 1 y 3. El tipo 1 está asociado a las infecciones del tracto urinario y el tipo 3 interviene a la adherencia a los epitelios del tracto respiratorio y urinario^{84,132}.

K. pneumoniae tiene tres proteínas de membrana externa (OMPs), porinas OmpK35, OmpK36 y OmpK37, que ligan macrófagos y células dendríticas.

Otro factor de virulencia es un plásmido de 180 kDa que codifica para la aerobactina, cuya función es captar el hierro del hospedero, elemento vital para el desarrollo de *Klebsiella* spp.

Dos mecanismos de enteropatogenicidad, uno de adherencia específico y otro de citotoxicidad, fueron comprobados a partir de cepas aisladas de heces de niños de 0 a 5 años⁹⁵.

Los factores de virulencia de *K. pneumoniae* se expresan en forma diferente en las infecciones de la comunidad y en las infecciones nosocomiales.

El gen *magA* específico del serotipo K1, es un gen de virulencia esencial para la síntesis del polisacárido capsular NTUH-K20440. Este polisacárido está asociado al aumento de la mucosidad y está presente en el 98 % de las cepas

invasoras de *K.pneumoniae*, que causan absceso hepático primario y abscesos metastásicos^{41, 43, 66, 124,152}.

Un gen asociado al metabolismo de la alantoína (allS) ha sido detectado solo en cepas K1 aisladas de absceso hepático primario, no así en cepas K2^{15,157}.

En un estudio sobre cepas de *K. pneumoniae* aisladas en 455 episodios de bacteriemia correspondientes a 7 países se demostraron diferencias geográficas. Así, la neumonía extrahospitalaria y un síndrome invasivo con abscesos hepáticos, meningitis o endoftalmitis se produjeron solo en Taiwán y Sudáfrica¹⁵⁸.

Los serotipos capsulares K1 y K2, el fenotipo mucoide y la producción de aerobactina fueron los factores de virulencia presentes en estos cuadros. El fenotipo mucoide se observó en el 94% de los pacientes con neumonía de la comunidad y en el 100% de las cepas que causaron cuadros invasivos en Taiwán y Sudáfrica, mientras solo un 2% fueron aislados en otros lugares. En este estudio se demostró además, que los aislamientos de *Klebsiella* de absceso hepático poseían el gen RMPA (regulador de fenotipo mucoide) y que la presencia de dicho gen y la producción de aerobactina estaban estrechamente relacionados.

Estudios genéticos mostraron que los aislamientos de *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* son genéticamente homogéneos y forman una familia única clonal (complejo clonal CC67) que puede distinguirse, en base a la secuencia de genes de todos los demás miembros de *K. pneumoniae*, incluyendo *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*^{15,45}.

K. oxytoca se ha reconocido como agente causal de colitis hemorrágica asociada al uso de antibióticos, cuadro que se resuelve espontáneamente con la suspensión del tratamiento^{52,160}. Los efectos citotóxicos sobre las células epiteliales humanas se limitan a la especie *K. oxytoca* y no se detectaron en otras especies de *Klebsiella*.

Características culturales

En los medios sólidos se observan colonias relativamente grandes, de aspecto húmedo y de bordes definidos, que con el ansa tienden a levantarse en forma filamentosa. La presencia de cápsula es la que le confiere la característica mucóide que no es exclusiva del género *Klebsiella*, ya que otras especies de enterobacterias pueden presentar el mismo tipo de desarrollo.

Por su propiedad de fermentar la lactosa, según el medio de aislamiento empleado variará el color de la colonia; así en agar MacConkey desarrollan dando colonias de color rojizo, en CLDE son blanquecino-amarillentas y en Levine (EMB) grisáceas con centro oscuro.

El fenotipo mucoso en algunos aislamientos clínicos puede estar ausente y, en estos casos, las colonias en medio de Levine aparecen como fermentadoras de lactosa, similares a las de *E. coli*.

K. granulomatis no desarrolla en medios convencionales, solo es cultivable empleando líneas celulares. En los exámenes microscópicos previa coloración de Giemsa o Wright-Giemsa se observan bacilos, una respuesta inespecífica crónica e importante tejido de granulación. Su diagnóstico definitivo se realiza por PCR.

Identificación a nivel de género y especie

En los medios de TSI o KIA (agar con hierro de Kligler) desarrollan con producción de ácido en base y pico (ácido/ácido), generalmente con abundante producción de gas que desplaza la columna de medio de cultivo en el tubo y sin SH₂. *Klebsiella* spp y *Enterobacter* spp. causan reversión rápida del pico de flauta, en las primeras 24 h de incubación^{58,94}.

La mayoría de las especies son indol negativas (a excepción de *K. oxytoca*, única especie productora de indol), todas son inmóviles, utilizan citrato como única fuente de carbono, fermentan adonitol, manitol, lactosa y sacarosa, desdoblan la urea, descarboxilan la lisina, no utilizan la ornitina (a excepción de *R. ornithinolytica*) y utilizan el malonato.

Si bien todas fermentan glucosa, algunas cepas de *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* y *Klebsiella pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* lo hacen lentamente. Las pruebas diferenciales entre especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella* se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Diferenciación de especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella*^a

Especies	IND	ODC	VP	MAL	ONPG	10°C	44°C	MEL	SOR	HIS
<i>K. pneumoniae</i> ^b	-	-	+	+	+	-	+	-	V	-
<i>K. oxytoca</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>K. ozaenae</i>	-	-	-	-	V	ND	ND	ND	V	ND
<i>K. rhinoscleromatis</i>	-	-	+	-	V	ND	ND	ND	V	ND

<i>R. planticola</i>	V	-	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>R. terrigena</i>	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>R. ornithinolytica</i>	+	+	V	+	+	+	ND	ND	+	+

IND: indol, ODC: ornitina descarboxilasa, VP: Voges Proskauer, MAL: malonato, ONPG: o-nitrofenilgalactopiranosido, 10°C y 44°C: desarrollo a esas temperaturas, MEL: D-melzitosa, SOR: L-sorbosa, HIS: histamina.

+, ≥90%; V, de 11 a 89 % -, ≤ 10%, ND: no determinado

^a *K. singaporensis* solo una cepa conocida.

^b *K. variicola* puede sospecharse frente a adonitol negativo, pero debe ser confirmada por secuenciación genética.

Se debe tener en cuenta que los tiempos de incubación pueden variar según la determinación: hasta 7 días para sorbosa y adonitol, 3 días para crecimiento a 10 °C y 2 días para las pruebas de histamina y melizitosa.

Si bien la mayoría de los aislamientos clínicos que son identificados como *Klebsiella* spp. pertenecen a *K. pneumoniae* o *K. oxytoca*, varias especies comparten un perfil bioquímico similar. Así es como un número de cepas clasificadas como *K. pneumoniae* podrían ser *R. planticola*, *R. terrigena*, o *K. variicola* (todas indol negativas) y algunas clasificadas como *K. oxytoca* podrían ser *R. planticola* indol positivas.

K. singaporensis (especie aislada, generalmente en el suelo), puede ser reconocida por su capacidad de crecer a 10° C, dar positiva la reacción de Voges-Proskauer, no producir indol y fermentar la L-sorbosa⁸⁹.

Las especies del género *Raoultella* crecen a 10°C y asimilan L-sorbosa, pruebas que permiten distinguirlas de *Klebsiella* spp., excepto *K. oxytoca*³.

Entre los comportamientos atípicos de algunas cepas de *K. pneumoniae* que dificultan la identificación y pueden conducir a error, se han descrito fenotipos con lisina descarboxilasa negativa, que no utilizan el citrato, no hidrolizan la urea o no producen acetoina.

Las características diferenciales de *K. pneumoniae* lisina negativas y enterobacterias con similar fenotipo se describen en la Tabla 6.

Tabla 6. Características diferenciales de *Klebsiella pneumoniae* lisina descarboxilasa negativa y enterobacterias con similar fenotipo

	Fenotipo mucoso	Adonitol	Malonato	Voges Proskauer	Urea
<i>K.pneumoniae</i> LDC (-)	+	+	+	+	+
<i>K. ozaenae</i>	+	+	—	—	—
<i>P. agglomerans</i>	—	—	V	V	—

+, ≥90%; V, de 11 a 89 %; —, ≤ 10%

La confusión en la identificación de *K. pneumoniae* y *P. agglomerans* surge fundamentalmente en que la segunda especie no degrada ninguno de los tres aminoácidos empleados en la identificación de enterobacterias (lisina, ornitina y arginina). A las diferencias indicadas se debe agregar que *P. agglomerans*, produce generalmente un pigmento amarillo, es anaerogénico y móvil.

K. oxytocalis lisina negativa se puede identificar erróneamente como *P. agglomerans* pues un bajo porcentaje de estos microorganismos producen indol.

Las cepas de *K. pneumoniae*. citrato negativas, *K. ozaenae* citrato variables y *K. rhinoscleromatis* citrato negativas pueden diferenciarse mediante las pruebas indicadas en la Tabla 5.

El uso de sistemas de identificación automáticos y semiautomáticos disminuye los tiempos y facilita la identificación. Estos sistemas requieren actualización permanente de sus bases de datos para ajustarse a los cambios taxonómicos.

En brotes hospitalarios, es esencial llegar a la identificación definitiva, teniendo en cuenta la ubicuidad de los microorganismos en el ambiente nosocomial, para poder controlar las cadenas de transmisión.

Identificación por métodos moleculares

La secuenciación parcial del gen que codifica para el ARNr 16S es muy utilizada para la identificación de la mayoría de las bacterias. El amplio uso de esta región se debe a que contiene una mezcla de regiones conservadas junto con otros segmentos altamente variables. Sin embargo, la utilidad del análisis de secuencia del ARNr 16S es limitada para el caso de *Klebsiella* y *Raoutella*, razón por la cual se ha recurrido al uso de genes adicionales para una correcta diferenciación de estos microorganismos: *rpoB* (subunidad β de la ARN polimerasa), *gyrB* (ADN girasa B) y gen cromosomal *bla* (β -lactamasa de clase A).

El análisis de la secuencia del gen cromosomal *bla* es una alternativa recomendable para la identificación de especies de *Klebsiella* y *Raoutella* debido a la mayor heterogeneidad observada con respecto a otros genes tales como *rpoB*^{96,150}.

Las guías provistas por el Clinical and Laboratory Standards Institute proporcionan información de gran utilidad al momento de la elección de los

genes apropiados y de la interpretación de los datos de secuencia obtenidos para la correcta identificación molecular²³.

Sensibilidad a los antibióticos

Klebsiella pneumoniae y *K. oxytoca* presentan resistencia natural a amino y carboxipenicilinas por producción de β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA). En *K. pneumoniae* se debe a una enzima cromosómica SHV-1, LEN u OKP (clase A de Ambler, grupo 2b de Karen Bush) que puede hiperproducirse por la adquisición de plásmidos y en *K. oxytoca* se debe a enzimas del tipo K1 (OXY-1 Y OXY-2) que se hiperproducen por mutaciones en el gen que codifica esta β -lactamasa e hidrolizan aminopenicilinas, ureidopenicilinas, carboxipenicilinas, cefalosporinas de 1^a y 2^a generación (excepto cefamicinas), de 3^a y 4^a generación (excepto ceftazidima *in vitro*) y monobactams, pero no carbapenems. Se comporta como una β -lactamasa de espectro extendido (BLEE).

A bajos niveles de producción, tanto SHV-1 como K1 son inhibidas por sulbactam, ácido clavulánico y tazobactam.

En la Argentina el principal mecanismo de resistencia a carbapenems es la combinación de BLEE e impermeabilidad, si bien se ha incrementado el número de cepas productoras de carbapenemasas de clase A, del tipo GES-2 y KPC, que hidrolizan todos los antibióticos β -lactámicos excepto aztreonam y no son afectadas por los inhibidores.

Hasta el año 2001 los carbapenems eran los únicos antimicrobianos totalmente activos sobre *K. pneumoniae*, sin embargo en ese año se describió

un nuevo mecanismo de resistencia producido por una β -lactamasa mediada por un plásmido, llamada KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa). Las β -lactamasas tipo KPC incluyen 10 miembros (variantes alélicas KPC-2 a KPC-11) pertenecen a la clase molecular A de Ambler y fueron reclasificadas en el grupo funcional 2f según Karen Bush. Se la considera como la más extrema de las carbapenemasas descritas, por su capacidad hidrolítica sobre penicilinas, cefalosporinas, monobactams y carbapenems, pero también sobre cefamicinas (cefoxitina) e inhibidores de β -lactamasas (sulbactam, tazobactam y ácido clavulánico)^{37,120, 142, 143}.

La resistencia a carbapenems puede ser mediada también por otros mecanismos distintos de KPC como por ejemplo la combinación de una β -lactamasa plasmídica de tipo AmpC y mutaciones en las porinas, que si bien son clínicamente importantes, no han sido documentados hasta hoy como causa de brotes, a diferencia de la resistencia mediada por KPC.

El laboratorio de microbiología debe estar atento para reconocer la presencia de estos mecanismos de resistencia.

Los indicadores de una probable resistencia a carbapenems son: a) detección de resistencia a carbapenems por cualquier método estandarizado de ensayo, b) sensibilidad a carbapenems con CIM elevadas y c) sensibilidad intermedia o resistencia a ertapenem por el método de difusión con discos.

Para la detección de cepas productoras de KPC, CHROMagar KPC (CHROM) constituye un método de tamizaje, altamente sensible y específico¹³⁰.

Una prueba para detectar rápidamente la presencia de cepas productoras de carbapenemasas a partir del cultivo es el Blue-Carba test¹¹⁹, con buena sensibilidad y especificidad.

La presencia del gen *KPC* debe ser confirmada por técnicas moleculares. La PCR en tiempo real es una estrategia rápida, sensible y de gran utilidad²¹.

La rápida diseminación de cepas de *K. pneumoniae* KPC positivas ha provocado un preocupante cambio epidemiológico mundial. Además, los genes de KPC se encuentran en elementos genéticos móviles, especialmente en un transposón (*Tn4401*) que facilita la transferencia entre plásmidos y entre especies bacterianas.

KPC se reportó principalmente en *K. pneumoniae*, pero se ha descrito también en distintas especies bacterianas como *E. coli*, *S. marcescens*, *Enterobacter* spp. etc.

Paralelamente en el transposón *Tn4401* se han encontrado genes que codifican para otras β -lactamasas (BLEE y BLEA) y genes que confieren resistencia a otros antibióticos no β -lactámicos, como genes de resistencia plasmídica a quinolonas y enzimas modificadoras de aminoglucósidos. Esta acumulación de genes de resistencia produce un fenotipo de resistencia extrema asociada a cepas productoras de KPC.

La detección de estos mecanismos es de gran trascendencia epidemiológica, por que la presencia de estas carbapenemasas determina una alta probabilidad de falla de tratamiento y además se trata de enzimas con gran capacidad de diseminación^{104, 116, 117, 120}.

Debido a la multirresistencia asociada a cepas productoras de KPC, los antimicrobianos con más actividad in vitro son: tigeciclina, colistina y fosfomicina.

A la aparición de cepas productoras de KPC, de diseminación intercontinental, se le suma una nueva carbapenemasa de la familia de las metaloenzimas tipo NMD(Nueva Delhi metalo β -lactamasa) que como las demás MBL confiere resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos, excepto al aztreonam.

A diferencia de lo que ocurre con KPC, las bacterias productoras de NMD tienen capacidad de diseminarse dentro y fuera del ámbito hospitalario. La transmisión de este mecanismo de resistencia es tanto vertical (expansión clonal) como horizontal (transferencia a otras especies de bacilos gram negativos).

Estas cepas se describieron en 2010 en EE.UU. y Canadá. En 2012 se notificaron dos aislamientos de *K. pneumoniae* en Guatemala¹¹⁵, un brote por *K.pneumoniae* en pacientes pediátricos en Colombia y también aparecieron cepas de otros bacilos gram negativos en Brasil, Paraguay y Uruguay. En 2013 el Laboratorio Nacional de Referencia en Argentina (LNR) lanzó un alerta epidemiológico a partir de la aparición de NMD en una cepa de *Providencia rettgeri*.

Los laboratorios de Microbiología cuentan con herramientas para la detección fenotípica de estas carbapenemasas. Su identificación debe realizarse con rapidez ante la necesidad de contención del caso^{106, 119}.

Dada la dinámica de diseminación de estos mecanismos y la posibilidad de emergencia de otros nuevos, se requiere la confirmación molecular de los mismos por el Laboratorio Nacional de Referencia.

Género *Enterobacter*

Aspectos taxonómicos

Desde el final del siglo XIX (1885) se sucedieron numerosos estudios taxonómicos para ubicar cepas que producían grandes cantidades de gas y que dieron lugar al género *Aerobacter*⁵⁴, con *Aerobacter aerogenes* como cepa tipo. En 1960 Hormaeche y Edwards propusieron un nuevo género “*Enterobacter*” para sustituir al género *Aerobacter* donde se ubicaba la especie *Aerobacter cloacae*. Se reconoció entonces a *Enterobacter cloacae* como la cepa tipo, de acuerdo a la primera edición del Manual de Bergey (1923).

Dada la heterogeneidad genética de las especies del género *Enterobacter* y otros géneros relacionados la clasificación taxonómica sigue en permanente revisión.

Hasta el año 2012 dentro del género *Enterobacter* se incluían las siguientes especies: *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter amnigenus* biogrupo 1, *Enterobacter amnigenus* biogrupo 2, *Enterobacter cancerogenus*, *E. cloacae*, *Enterobacter cowanii*, *Enterobacter dissolvens*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter*

hormaechei, *Enterobacter intermedium*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter nimipressuralis* y *Enterobacter pyrinus*^{61,62,63}.

En 2013 Brady y colaboradores propusieron, en base a análisis fenotípicos, moleculares y químicos, una reclasificación de algunas especies de los géneros *Enterobacter* y *Cronobacter*. Como consecuencia de dichos estudios surgieron tres nuevos géneros: *Lelliottia*, *Pluralibacter* y *Kosakonia*¹⁴.

En 2014 Roger Stephan, reubicó a *E. turicensis*, *E. helveticus* y *E. pulveris* en dos nuevos géneros: *Siccibacter* y *Franconibacter* dando lugar a las especies: *Siccibacter turicensis*, *Franconibacter helveticus* y *Franconibacter pulveris*¹³⁸.

Epidemiología, transmisión y significado clínico

Las especies que integran los géneros *Enterobacter*, *Cronobacter* y *Pantoea* se encuentran como comensales en el medio ambiente^{13, 113, 140,141}, en fórmulas alimentarias^{34, 57,153}, en la piel y en el tracto intestinal de humanos y animales. Antes del uso generalizado de los antibióticos eran raramente encontradas como patógenos.

Debido a su ubicuidad, la fuente de infección puede ser endógena o exógena.

En numerosos estudios se ha responsabilizado a las manos del personal, a dispositivos médicos contaminados y a la instrumentación como fuentes de diseminación. En brotes nosocomiales se las ha encontrado en soluciones de nutrición parenteral, soluciones salinas, equipos de diálisis, agua

de hidroterapia, etc.^{26, 111,140}, sin embargo muchas infecciones tienen su origen en la flora endógena del paciente⁷¹.

Enterobacter cloacae y *E. aerogenes*, son las especies más frecuentemente aisladas como responsables de infecciones nosocomiales diversas¹²⁹, incluyendo bacteriemia, infecciones del tracto respiratorio inferior, de piel y tejidos blandos, del tracto urinario, intraabdominales, endocarditis, artritis séptica, osteomielitis, infecciones oftálmicas e infecciones posquirúrgicas en cualquier parte del cuerpo. Son unos de los agentes más agresivos en localización ocular^{74, 100,103, 121, 151,156}.

Enterobacter ludwigii y todas las subespecies de *Enterobacter hormaechei* también se aíslan en una variedad de fuentes humanas⁶³, incluyendo la sangre.

Períodos prolongados de internación, uso de antimicrobianos, presencia de dispositivos extraños (catéteres intravenosos, sondas etc.) y condiciones subyacentes (quemaduras, ventilación mecánica, inmunosupresión) constituyen factores de riesgo que aumentan el riesgo de infecciones por *Enterobacter* spp.

Las infecciones adquiridas en la comunidad, incluyen infecciones urinarias, de la piel y tejidos blandos y de heridas, especialmente traumáticas.

Aspectos patogénicos

Si bien las especies del género *Enterobacter* no se consideraron agentes primarios causales de infecciones humanas, estudios epidemiológicos han

demostrado que algunas de ellas son agentes etiológicos relevantes en infecciones nosocomiales.

Entre los factores de virulencia identificados en distintas especies se encuentran la presencia de polisacárido capsular y la producción de hemagglutininas manosa sensibles asociadas a fimbrias tipos 1 o tipo 3 y quelantes del hierro (aerobactina y *enterochelin*).

En *E.cloacae* se ha demostrado la adhesión y penetración a las células epiteliales e inducción a la apoptosis⁷⁸.

La plasticidad genómica del complejo *E.cloacae* quedó fuertemente evidenciada en un brote producido en Holanda por una cepa de *E. hormaechei* portadora de múltiples mecanismos de virulencia codificados tanto por genes constitutivos como por elementos adquiridos¹¹¹.

La capacidad de *Enterobacter* spp. de transportar plásmidos que codifican resistencia a numerosos antimicrobianos, es otro factor de gran importancia relacionado con las infecciones nosocomiales⁹⁹.

Características culturales

Las especies ambientales (*E. pulveris* y *E. turicensis*) y la mayoría de las cepas de *Cronobacter sakazakii* y *Pantoea agglomerans* así como *Leclercia adecarboxilata* y *Photorhabdus asymbiotica*, producen un pigmento amarillo brillante que se intensifica si los cultivos se incuban a 25°C^{140,141}.

Las colonias de *L. adecarboxilata* y *P. asymbiotica*, presentan además una luminiscencia observable en una habitación oscura al cabo de cinco minutos.

P. agglomerans, produce un pigmento amarillo menos intenso, que en general se visualiza luego de una incubación prologada a temperatura ambiente.

E. cancerogenus, en agar MacConkey, después de tiempos prolongados de incubación presenta colonias con centro color púrpura.

Identificación a nivel de género y especie

Fermentan la glucosa, reducen nitratos y nitritos, son citocromooxidasa negativos y catalasa positivos, son móviles, (excepto *E. asburiae*) la mayoría descarboxilan la ornitina (excepto *E. cowanii*)

El comportamiento de la mayoría de las especies del género *Enterobacter* frente a las pruebas bioquímicas iniciales se muestran en la Tabla 7.

En medio TSI fermentan los azúcares con producción de ácido en el fondo del tubo y en el pico, generalmente con abundante producción de gas, que desplaza la columna del medio de cultivo. No producen SH₂.

En la Tabla 8 se observan las características bioquímicas que diferencian especies de los géneros *Enterobacter*, *Cronobacter* y *Pantoea*.

A partir del comportamiento en las pruebas de lisina descarboxilasa (LDC) arginina dihidrolasa (ADH) y ornitina descarboxilasa (ODC), con un mínimo número de pruebas adicionales se pueden diferenciar algunas especies de *Enterobacter*.

E. aerogenes y *E. cloacae* se distinguen por la descarboxilación de lalislina, positiva y negativa respectivamente.

Tabla 7. Pruebas bioquímicas comunes a la mayoría de las especies de *Enterobacter*

Prueba	Resultado
TSI (agar con hierro y triple azúcar)	ácido/ácido con producción de gas
ONPG (o-nitrofenilgalactopiranosido)	positivo
SIM (sulfhídrico, indol, movilidad ^a)	negativo, negativo, positivo
Citrato de Simmons	positivo
Urea de Christensen	variable
Rojodemetilo	negativo
Voges Proskauer	positivo
Lisina descarboxilasa	85-95% de las cepas negativas
Ornitina descarboxilasa ^b	positiva
Arginina dihidrolasa	variable

^a*E. asburiae* no es móvil, ^b*E. cowanii* es ODC negativo

E. gergoviae y *E. aerogenes*, que tienen un patrón de descarboxilación similar: (LDC +, ODC +, ADH-), se pueden diferenciar con el agregado de dos azúcares (adonitol y sorbitol) y con la hidrólisis de la urea. *E. gergoviae* no fermenta adonitol ni sorbitol y es ureasa fuertemente positiva, mientras que *E. aerogenes* fermenta los dos azúcares y es ureasa negativo.

E. asburiae es bioquímicamente similar a *E. cloacae*, pero es la única especie inmóvil del género y da negativa la prueba de Voges Proskauer.

Tabla 8.Características bioquímicas que diferencian especies de los géneros *Enterobacter*, *Cronobacter* y *Pantoea*

ESPECIES	LDC	ADH	ODC	VP	SAC	ADO	SBL	RAM	ESC	MEL	PIG	MDG
HUMANAS												
<i>E. aerogenes</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>P. agglomerans</i>	-	-	-	V	V	-	V	V	V	V	V	-
<i>E. amnigenus</i> biogroupo 1	-	-	V	+	+	-	-	+	+	+	-	V
<i>E. asburiae</i>	-	V	+	-	+	-	+	-				
<i>E. cancerogenus</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>E. cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	-	+	+	+	+	V	+	+	V	+	-	V
<i>E. cowanii</i>	-	-	-	+	+	-	+	+				-
<i>E. gergoviae</i> ^a	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>hormaechei</i>	-	V	+	+	+	-	-	+	-	-	-	V
<i>E. kobei</i>	-	+	+	-	+	-	+	+	V	+	-	+
<i>C. sakazakii</i>	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
AMBIENTALES												
<i>E. amnigenus</i> biogroupo 2	-	V	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
<i>E. cloacae</i> Subsp. <i>disolvens</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>E. nimipresuralis</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
<i>E. pyrinus</i> ^a	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>E. radicitans</i>	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-

LDC: lisina descarboxilasa, ODC: ornitina descarboxilasa, ARG: arginina dihidrolasa, VP: Voges Proskauer, SAC: sacarosa, ADO: adonitol, SBL: sorbitol, RAM: L-ramnosa, ESC: esculina, MEL, melibiosa, PIG: pigmento amarillo, MDG:α-metil-D-glucósido, + : ≥90%, v: de 11 a 89 % - : ≤ 10%

^a *E. pyrinus* se diferencia de *E. gergoviae* por su crecimiento en caldo cianuro de potasio, la producción de ácido a partir de mio-inositol y la no fermentación de rafinosa.

E. hormaechei bioquímicamente similar a *E. cancerogenus* excepto que es ureasa positivo, sacarosa, positivo y esculina negativo.

E. ludwigii y *E.hormaechei*, especies que previamente pertenecían al complejo *E. cloacae*, se pueden separar de éste mediante crecimiento en α -metil-D-glucopiranosido y putrescina y 3-hidroxibutirato, respectivamente^{61, 63}.

Las tres subespecies de *E. hormaechei* (que corresponden a los grupos VI, VII y VIII del complejo *E. cloacae*) se pueden separar a través de la fermentación de adonitol, dulcitol y D-sorbitol (Tabla 9).

Tabla 9.Diferenciación de subespecies de *E. hormaechei*

Subespecies	Ácido de adonitol	Ácido de dulcitol	Ácido de D-sorbitol
<i>E.hormaechei</i> subsp. <i>hormaechei</i>	-	+	-
<i>E.hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>	+	-	+
<i>E.hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>	-	-	+

+ : $\geq 90\%$, - : $\leq 10\%$

Debido a la heterogeneidad genética de varias especies, los miembros de los géneros *Enterobacter* y *Pantoea* confunden a los sistemas comerciales más a menudo que otros géneros⁷¹.

Especies de los géneros *Cedecea*, *Enterobacter* y *Cronobacter* comparten los resultados de las pruebas de Voges Proskauer, arginina dihidrolasa y ornitina descarboxilasa, las cuales son variables o positivas. En la Tabla 10 se indican las pruebas que permiten la separación de los mismos.

Tabla 10. Pruebas que permiten la separación de especies de los géneros *Cedecea*, *Enterobacter* y *Cronobacter* que comparten resultados de VP, ADH y ODC (variable o positivo)

Especies	SBL	RAF	RAM	MEL	ABL	SAC
<i>Cedecea davisae</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Cedecea lapagei</i>	-	-	-	+	+	-
<i>E. cloacae</i>	+	+	+	+	V	-
<i>Cronobacter sakazakii</i>	-	+	+	+	-	+
<i>E. cancerogenus</i>	-	-	+	-	-	-

SBL: D-sorbitol, RAF: rafinosa, RAM: L-ramnosa, MEL: melibiosa, ABL: D-arabitol, SAC: sacarosa, + : $\geq 90\%$, V : de 11 a 89 %, - : $\leq 10\%$

Identificación por métodos moleculares

Aún no se han consensuado marcadores moleculares específicos para la identificación del género *Enterobacter*.

Como ocurre con las demás enterobacterias las secuencias de los genes del ARNr 16S presentan similitudes mayores del 97-98% razón por la cual esta molécula tiene bajo poder de discriminación a nivel de especie.

La recomendación es realizar un análisis de secuencia de genes adicionales que codifiquen para proteínas. El análisis de secuencia multilocus (MLSA) basado en los genes *recN* (recombinación y reparación de proteínas), *rpoA* (subunidad α de la ARN polimerasa) y *thdF* (oxidación de tiofeno y furano) parece ser una alternativa útil para una correcta asignación de las especies^{23,137}.

Sensibilidad a los antibióticos

Enterobacter spp. presenta resistencia natural a ampicilina, amoxicilina y cefalosporinas de primera generación e inhibidores de β -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactama y tazobactama) conferida por una β -lactamasa cromosómica. Ésta es una enzima del tipo AmpC perteneciente al grupo 1 de Karen Bush (Clase C de Ambler). Hay algunas excepciones, especialmente con sulbactama y tazobactama.

Al igual que en *Citrobacter freundii* en *Enterobacter* spp., casi exclusivamente, la resistencia a cefoxitina es considerada como el mejor marcador de la presencia de esta β -lactamasa del tipo AmpC.

La producción de β -lactamasas es el mecanismo más importante responsable de la resistencia en la mayoría de estas especies. Estas enzimas pueden inducirse frente a antibióticos β -lactámicos generando resistencia a cefalosporinas de tercera generación (C3G), pero lo de mayor importancia (en *Enterobacter* spp. y *Serratia* spp.) es la hiperproducción de AmpC por mutantes desreprimidas. Este mecanismo confiere resistencia a cefalosporinas de tercera generación, monobactames, carboxi y ureidopenicilinas y las combinaciones con inhibidores como ácido clavulánico y sulbactama.

La adquisición de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) les confieren resistencia a C3G, resistencia variable a cefalosporinas de cuarta generación (C4G) y a piperacilina-tazobactama, por lo que su presencia invalida el uso de C3G. El uso de C4G incluso puede provocar la selección de mutantes resistentes.

Los aislamientos productores de AmpC son sensibles a tigeciclina y pueden ser sensibles a aminoglucósidos o trimetoprima-sulfametoxazol.

En *Enterobacter*, como en otras enterobacterias, se ha observado un aumento de la resistencia a antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos, trimetoprima-sulfametoxazol y quinolonas, con variaciones geográficas¹³⁵.

Un problema de importancia epidemiológica lo constituye la presencia de cepas productoras de AmpC junto a plásmidos codificadores de BLEE, observado especialmente en *E. cloacae* (una de las especies más frecuentemente aislada a partir de muestras clínicas).

La resistencia a carbapenemes puede estar mediada por acción de diferentes metalobetalactamasas (MBL) y carbapenemasas (p. ej. KPC) que hidrolizan imipenem y meropenem en distintos niveles. Las infecciones por cepas productoras de carbapenemasas, requieren una terapia combinada. Tigeciclina, colistina y fosfomicina son los antimicrobianos con mayor actividad *in vitro*.

Las MBL presentan actividad enzimática sobre carbapenemes al igual que sobre las carboxi y acilureidopenicilinas y sobre las cefalosporinas tanto de espectro reducido como de espectro extendido. Solo el aztreonam evade la acción hidrolítica de estas carbapenemasas, siempre que no haya otros mecanismos presentes. La presencia de una BLEE sumada a una MBL da como resultado la resistencia al aztreonam.

La presencia de carbapenemasas de tipo KPC genera multirresistencia: inactiva piperacilina-tazobactama, C3G y C4G y se suma a la resistencia a fluoroquinolonas y aminoglucósidos. Las únicas opciones terapéuticas que

quedan en estos casos sorigeciclina y colistina, con sus limitaciones farmacocinéticas y sus efectos colaterales.

La instauración de un tratamiento antimicrobiano apropiado depende en primera instancia, de la detección de los mecanismos de resistencia presentes por parte del laboratorio de microbiología.

Género *Pantoea*

Aspectos taxonómicos

En el género *Pantoea* se describen trece especies: *P. agglomerans*, *Pantoea septica*, *Pantoea eucrina*, *Pantoea brenneri*, *Pantoea conspicua*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea dispersa*, *Pantoea stewartii* (*P. stewartii* subsp. *stewartii* y *P. stewartii* subsp. *indologenes*), *Pantoea vagans*, *Pantoea eucalypti*, *Pantoea deleyi*, *Pantoea anthophilay* *Pantoea cyripedii*.

Las cinco primeras han sido aisladas en muestras humanas, (orina, sangre, heridas y órganos internos)¹²⁷.

Las ocho especies restantes se han encontrado en plantas, semillas, frutas, suelo y agua.

La clasificación taxonómica de las especies que componen este género se basó en el análisis de secuencia multilocus de los genes *gyrB*, *rpoB*, *atpD* e *infB*¹³.

Epidemiología, transmisión y significado clínico

Se han reportado casos de bacteriemia por *P. agglomerans* asociadas a infusiones y material biomédico contaminado^{11,57}, de artritis, sinovitis u osteomielitis y casos de peritonitis en pacientes ambulatorios sometidos a diálisis peritoneal⁹¹.

P. agglomerans es causa de infecciones de tejidos blandos relacionadas con trauma penetrante por objetos contaminados con el suelo o la vegetación y además se la ha asociado con numerosas infecciones y brotes^{8, 25, 57, 81, 90, 102, 134, 148}.

P. septica, *P. eucrina*, *P. brenneri* y *P. conspicua* fueron reconocidas como causa de brotes¹³ y *P. ananatis* fue aislada en casos de bacteriemia²⁷.

Características culturales

Las bacterias de este género desarrollan bien en medios para enterobacterias, agar nutritivo y agar sangre. Lo hacen bajo la forma de colonias más o menos convexas, lisas, translúcidas, de borde entero. *P. agglomerans* suele presentar un pigmento amarillo. Otras especies pueden presentar pigmentación de color marrón pálido, rojizo pálido o amarillo-anaranjado.

Son anaerobios facultativos que pueden desarrollar entre los 30°C y los 37°C.

Identificación a nivel de género y especie

Son bacilos gram negativos, oxidasa negativos, catalasapositivos y reducen nitratos. En TSI fermentan la glucosa con producción de gas. Son indol negativos, Voges Proskauer positivos, citrato de Simmons positivos, no producen SH₂, no hidrolizan la urea y solo un 30% de las cepas descarboxilan lisina y/uornitina. Muchas especies utilizan el malonato.

P. agglomerans es muy difícil de identificar, ya sea con sistemas comerciales o bioquímicos convencionales^{109,110}. La pigmentación amarilla y las pruebas negativas de lisina, arginina y ornitina llevan a pensar en que una cepa puede pertenecer a la especie *P. agglomerans*.

La Tabla 8 muestra características bioquímicas que diferencian especies de los géneros *Enterobacter*, *Cronobacter* y *Pantoea*.

En la tabla 11 se puede observar el comportamiento fenotípico de las distintas especies del género *Pantoea*.

Todas las cepas de *P. agglomerans* presentan resistencia a fosfomicina mientras que las demás especies son sensibles, por lo que esta prueba, realizada por el método de difusión, es de gran utilidad para una identificación presuntiva²⁹.

Identificación por métodos moleculares

Los estudios de secuenciación de genes específicos pueden proporcionar información adicional para la identificación de la mayoría de las especies. El análisis de secuencia de los genes *gyrB*, *rpoB*, *ataD* e *infB*

resultan de mayor utilidad que la secuenciación del ARNr 16S al momento de la identificación a nivel de especie¹³.

Ante la sospecha de brote la confirmación del mismo requiere de técnicas moleculares que están disponibles en laboratorios de referencia.

Tabla 11. Características fenotípicas que distinguen las especies de *Pantoea*^a

Especie	IND	PHE	GLI	DUL	INO	CEL	LAC	RAF
<i>Pantoea agglomerans</i>	-	d	(d)	-	(d)	d	d	(d)
<i>Pantoea ananatis</i>	+	-	+	-	+	+	+	+
<i>Pantoea dispersa</i>	-	-	(d)	-	d	d	d	-
<i>P. stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>P. stewartii</i> subsp. <i>indologenes</i>	+	-	d	-	+	+	+	+
<i>Pantoea vagans</i>	-	+	d	-	+	-	d	-
<i>Pantoea eucalypti</i>	-	+	d	-	+	d	d	-
<i>Pantoea deleyi</i>	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Pantoea anthophila</i>	-	+	+	-	+	+	-	-
<i>Pantoea cypripedii</i>	-	+	+	-	+	+	-	-
<i>Pantoea septica</i>	-	+	d	-	d	d	d	-
<i>Pantoea eucrina</i>	-	d	-	-	d	d	d	-
<i>Pantoea brenneri</i>	-	d	d	d	d	d	d	d
<i>Pantoea conspicua</i>	-	+	-	+	+	+	+	-

^aResultados obtenidos mediante el empleo de sistemas miniaturizados basados en fermentación y utilización de azúcares y de fuentes de carbono a 28°C (api ID32E, api 20E, api 50CHE, Biotype 100)^{13,29}. IND: indol, PHE: fenilalanina desaminasa, GLI: glicerol, DUL: dulcitol, INO: inositol, CEL: celobiosa, LAC: lactosa, RAF: rafinosa. + : 90-100% cepas positivas en 1-4 días, d : 11-89% cepas positivas en 1-4 días, (d) : 11 -89% cepas positivas en 3-4 días, - : resultados negativos.

Sensibilidad a los antibióticos

Las cepas de *P. agglomerans* son generalmente sensibles a aminoglucósidos, fluoroquinolonas y trimetoprima sulfametoxazol. Todas ellas presentan sensibilidad a imipenem y a cefalosporinas de amplio espectro.

Género *Cronobacter*

Aspectos taxonómicos

Un cambio de importancia clínica fue la reubicación de *Enterobacter sakazakii* en un nuevo género *Cronobacter* en 2007.

Una actualización taxonómica sobre la base de evaluaciones extensas de genotipo y fenotipo, dio lugar a la definición de seis nuevas especies adicionales y de una genomoespecie^{68,153} (Tabla 12). Varios estudios avalan esta nueva clasificación^{14, 77, 79, 80, 113}. De acuerdo a la actualización de Brady, tres especies del género *Enterobacter* se reubicaron en el género *Cronobacter*: *E. turicensis*, *E. helveticus* y *E. pulveris* como *Cronobacter zurichensis*, *Cronobacter helveticus* y *Cronobacter pulveris*¹⁴.

Tabla 12. Distribución de biogrupos dentro del género *Cronobacter*

Especies de <i>Cronobacter</i>	Biogrupos
<i>Cronobacter sakazakii</i> sp. nov.	1, 2-4, 7, 8, 11 y 13
<i>Cronobacter malonaticus</i> sp. nov.	5, 9, y 14
<i>Cronobacter turicensis</i> sp. nov.	16
<i>Cronobacter muytjensii</i> sp. nov.	15

<i>Cronobactercondimenti</i> sp. nov.	1
<i>Cronobacter universalis</i> sp. nov.	Genomoespecies separadas
<i>Cronobacterdublinensis</i> .sp. nov	
<i>Cronobacter dublinensis</i> subsp. <i>dublinensis</i> subsp. nov.	12
<i>Cronobacter dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i> subsp. nov.	10
<i>Cronobacter dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i> subsp. nov.	6

Epidemiología, transmisión y significado clínico

Cronobacter (Enterobacter) sakazakii, patógeno oportunista transmitido por los alimentos ha causado infecciones neonatales graves, tales como abscesos cerebrales, meningitis, enterocolitis necrotizante y sepsis^{67, 88,147}. También se lo aisló en cuadros graves en ancianos y adultos inmunocomprometidos.

C. turicensis, también oportunista, es un agente causal raro de infecciones potencialmente mortales en neonatos.

Aspectos patogénicos

En *C. sakazakii* el marcador de virulencia mejor caracterizado es una proteína de membrana externa A, codificada por el gen *ompA*⁹⁸. Otros mecanismos demostrados son: la producción de una enterotoxina en aislamientos clínicos y transmitidos por alimentos¹¹² y su potencial invasivo en células de la barrera intestinal¹⁴⁷.

En *C.turicensis* como determinantes específicos de virulencia se encontraron el polisacárido capsular, el antígeno O de la superficie, sideróforos, fimbrias, *pili*, y proteínas efectoras, entre otros¹³⁹.

Características culturales

Las especies del género *Cronobacter*, son bacilos gram negativos anaerobios facultativos, móviles, de 1 µm a 3µm de largo. Crecen fácilmente a 25°C en agar tripteína de soja (TSA) y el 92 % de las cepas dan colonias con un pigmento amarillo característico al cabo de 48-72 h de incubación⁶⁹.

Si bien el rango de temperatura de desarrollo va desde 6°C a 47°C, la producción de pigmento y el tamaño de las colonias están muy influenciados por la temperatura de incubación y son mayores a 25° C que a 36° C.

En medio TSA las colonias tienen dos presentaciones: unas de aspecto mate y consistencia mucosa y las segundas de superficie brillante, lisa y con frecuencia con poca producción de pigmento. Al realizar subcultivos, estas características pueden sufrir cambios. En relación con el origen de los aislamientos se han observado diferencias en el aspecto de las colonias. Las cepas clínicas presentan aspecto mucoide mientras que las de origen ambiental son rugosas, de aspecto mate y textura gomosa.

La actividad de la α-glucosidasa, única en el género *Cronobacter*, ha sido empleada como marcador selectivo en los medios cromogénicos.

En los últimos años se han desarrollado medios fluorogénicos y cromogénicos de gran aplicación en la industria alimentaria y en muestras ambientales. Entre ellos podemos citar alagar CCI (*Chromogenic Cronobacter*

isolation agar Oxoid), al agar ESIA, (*Enterobacter sakazakii isolation agar*), al agar DFI (Druggan-Forrsthe-Iversen) y al agar DFI modificado.

Identificación a nivel de género y especie

Estas bacterias generalmente dan reacciones positivas para catalasa, reducción de nitratos, utilización de citrato, producción de acetoina (Voges-Proskauer), esculina y arginina. Producen ácido de D-glucosa, D-sacarosa, D-rafinosa, D-melibiosa,D-celobiosa, D-manitol, D-manosa, L-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa, D-trehalosa, galacturonato y D-maltosa. *Cronobacter* metaboliza los sustratos: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-glucopiranosido, 4 metilumbeliferil- α -D-glucopiranosido, 4-nitrofenil- β -D-glucopiranosido, 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosido, 4 -nitrofenil- α -D-galactopiranosido y 4-nitrofenil- β -D-galactopiranosido. Dan negativas las pruebas de oxidasa,rojo de metilo, la producción de sulfuro de hidrógeno, ureasa, lisina, β -D-glucuronidasa y el metabolismo de D-sorbitol, eritritol, mucato, tartrato, 5-cetogluconato, ácido D-sacárico, piruvato de sodio, glucosa-1-fosfato, glucosa-6-fosfato, adonitol y arabitol⁶⁹.

Cuatro pruebas bioquímicas con relevancia estadística permiten diferenciar las especies del género *Cronobacter*entre sí: indol, malonato, producción de gas a partir de dulcitol y de α -D-metilglucósido (Tabla 13).

Tabla 13.Diferenciación de las especies y subespecies de *Cronobacter*

Especies y subespecies	IND	MAL	DUL	MDG

<i>C. sakazakii</i> subsp. <i>sakazakii</i>	-		-	+
<i>C. sakazakii</i> subsp. <i>malonaticus</i>	-	+	-	+
<i>Cronobacter muytjensii</i>	+	+	+	-
<i>Cronobacter dublinensis</i>	+	v	-	+
<i>Cronobacter turicensis</i>	-	+	+	+
<i>Cronobacter</i> genomospecie 1	-	+	+	+

IND: production de indol, DUL: producción de ácido a partir de dulcitol, MAL: utilización de malonato, MDG: producción de ácido a partir de α -metil-D-glucósido, + : 85–100% positivos, v : 15–85% positivos, - : menos del 15% positivos.

Los sistemas multipruebas, tales como API 20E, ID32E (bioMérieux), empleados en la tipificación de enterobacterias, mostraron resultados conflictivos en la identificación de *Cronobacter* spp. Se han reportado resultados tanto falsos positivos como negativos.

El sistema 50CHE API ha demostrado ser más confiable, con resultados similares a los obtenidos por secuenciación de ADN.

Entre otros métodos alternativos empleados para la identificación podemos mencionar la nueva versión de VITEK 3.0, que mostró una sensibilidad del 100% y el empleo de espectrometría de masas MALDI-TOF MS, que proporcionó resultados idénticos a los obtenidos por otros estudios moleculares.

Sistemas de identificación

Cuando se emplean sistemas comerciales para la identificación, ésta se puede considerar confiable cuando la probabilidad de precisión supera el

90%. La identificación de microorganismos aislados de sitios estériles con una probabilidad menor del 90% requiere su confirmación por métodos convencionales o mejor por métodos moleculares. Mientras tanto, el aislamiento puede ser informado con una identificación presuntiva.

Las especies raras que se identifican con bajas probabilidades siempre se deben enviar a un laboratorio de referencia adjuntando el resumen de historia clínica.

Evaluación, interpretación y presentación de informes de los resultados

Cuando el laboratorio adopta cambios taxonómicos, que impliquen modificaciones de nomenclatura., el informe debe contener la nueva denominación, seguida de la anterior entre paréntesis.

Identificación por métodos moleculares

Dos estrategias se pueden emplear en la identificación de *Cronobacter* de acuerdo al objetivo perseguido:

a) En la industria alimentaria se requiere contar con un método simple rápido y sensible para descartar la presencia de *Cronobacter* spp. como patógeno contaminante. La PCR en tiempo real aplicada al estudio de genes tales como *ompA*, *dnaG* y *gluA* es una herramienta útil para este fin.

b) La Identificación a nivel de género y especie se puede alcanzar a través de la secuenciación de genes específicos. El gen *recN* mostró un alto poder de discriminación comparado con la secuenciación del *ARNr-16 S*^{38,69}.

Sensibilidad a los antibióticos

Existe muy poca información respecto del perfil de sensibilidad de estas bacterias. Son resistentes naturales a bencilpenicilina, oxacilina y vancomicina como el resto de las enterobacterias. Se observó que la mayoría eran resistentes a cefalosporinas de primera generación probablemente por la presencia de enzimas del tipo AmpC como CSA-1 y CSA-2 en *C. sakazakii* y CMA-1 y CMA-2 en *C. malonaticus*^{100a}.

También se registraron altos porcentajes de resistencia a tetraciclinas y quinolonas. La mayor parte de las cepas estudiadas presentó sensibilidad a TMS y gentamicina.

Género *Serratia*

Aspectos taxonómicos

La mayoría de las especies del género *Serratia*, están distribuidas en el medio ambiente, el suelo y los reservorios animales.

En el hombre pueden encontrarse colonizando la mucosa intestinal, el tracto respiratorio, el tracto urinario, heridas, etc. y a nivel nosocomial en ambientes y reservorios como el agua potable, cañerías e insumos hospitalarios^{17, 144}.

Serratia marcescens fue descubierta en 1819 por Bartolomeo Bizio, un farmacéutico de Padua, Italia, en una papilla de harina de maíz (polenta). La bacteria que causaba una coloración sanguinolenta “milagrosa” se denominó *Serratia* en honor de un físico italiano llamado Serrati y *marcescens* (de la palabra latina que significa descomposición), porque el pigmento rojizo (prodigiosina) se deterioraba rápidamente.

S. marcescens es agente causal de infecciones nosocomiales y de la comunidad, pero también se la responsabiliza de mastitis en vacunos y ovinos, enfermedad en corales, insectos y plantas. Se aísla del agua, gusanos de seda, tortugas, peces, lagartijas etc. y puede crecer en alimentos.

Serratia fonticola y *Serratia* grupo *liquefaciens* son las especies más frecuentemente aisladas en medio ambiente.

S. grupo *liquefaciens*, *Serratia rubidaea*, *Serratia fonticola*, *Serratia ficaria*, *Serratia plymuthica* y *Serratia odorifera* son agentes causales poco frecuentes, pero bien documentados, de infecciones humanas^{2, 6, 39, 52, 87, 133}.

Actualmente el género *Serratia* está constituido por las especies: *S. fonticola*, *S.* grupo *liquefaciens*, *Serratia entomophila*, *S. ficaria*, *S. marcescens* subsp. *marcescens*, *S. marcescens* biogroupo1, *S. odorifera* biogroupo1, *S. odorifera* biogroupo2, *S. plymuthica* y *S. rubidaea*.

Serratia marcescens es el agente causal más importante de infección entre todas las especies recuperadas de muestras clínicas humanas.

El grupo *Serratia liquefaciens* está constituido por: *S. liquefaciens* sensu stricto, *Serratia proteamaculans* y *Serratia grimesii*., especies que no se pueden distinguir por pruebas bioquímicas, por lo que deben ser informadas como "*Serratia grupo liquefaciens*"⁵.

Serratia ureilytica, *Serratia quinivorans*, *S. plymuthica*, *S. entomophila* y *S. ficaria* son microorganismos ambientales y causas poco frecuentes de enfermedad humana^{6,10}.

Epidemiología, transmisión y significado clínico

Las bacterias del género *Serratia* son consideradas como patógenos oportunistas. La internación es el principal factor de riesgo para desarrollar infección por estos microorganismos, especialmente en salas de cuidados intensivos y de neonatología.

La colocación de catéteres intravenosos, intraperitoneales o de la vía urinaria y la instrumentación anterior de las vías respiratorias se han identificado como factores predisponentes entre los pacientes hospitalizados.

Una revisión bibliográfica sobre casos de brotes permite confirmar la diversidad de reservorios como fuentes de diseminación^{12, 24, 46,144} por lo que, las campañas de lavado de manos, control de la potabilización del agua y asepsia de instrumentos hospitalarios son imprescindibles para evitarlos^{17,28,64}.

La infección del tracto urinario, se da mayormente (90% de los casos) en pacientes con antecedentes de cirugía reciente o instrumentación del tracto urinario.

La infección del tracto respiratorio aparece generalmente en colonizados con *Serratia* spp. después de la instrumentación y especialmente en aquellos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Las meningitis o los abscesos cerebrales por *Serratia* pueden darse en niños prematuros y recién nacidos con sepsis previa.

En adultos, *Serratia marcescens* es agente causal de infecciones del sistema nervioso central incluyendo meningitis y supuraciones focales y se lo ha asociado frecuentemente con los procedimientos neuroquirúrgicos.

Serratia spp. se detecta como agente de endocarditis, especialmente en los consumidores de drogas por vía intravenosa, comprometiendo por lo general la válvula aórtica o mitral. Las infecciones intraabdominales suelen presentarse con drenaje biliar, absceso hepático, absceso pancreático y exudado peritoneal. La peritonitis por *Serratia* puede complicar la diálisis peritoneal⁶⁰.

En personas que son adictas a las drogas por vía intravenosa, la diseminación hematógena de *S. marcescens* es causa de osteomielitis y artritis.

Serratia spp. se aísla como agente responsable de infecciones oculares en queratitis asociada al uso de lentes de contacto rígidas o blandas o causando endoftalmitis generalmente después de la cirugía ocular¹⁰¹.

Úlceras en la piel y abscesos diseminados son característicos de infección por *S. marcescens*¹³⁶.

En niños mayores y adultos con enfermedad granulomatosa crónica, *S. marcescens* es causa importante de infecciones de la piel. Allí forman

grandes úlceras multifocales con mala cicatrización, asociadas a infecciones en sitios crípticos internos^{47, 48, 49, 97}.

Las bacteriemias por *Serratia marcescens* se presentan con mayor frecuencia en pacientes con enfermedad de base como: diabetes, neoplasias e insuficiencia renal crónica.

Si bien *Serratia* spp. siempre se consideró como un patógeno nosocomial³⁹, un estudio realizado en Canadá en 2007 determinó que la mayoría (65%) de los incidentes fueron de inicio en la comunidad. Se comprobó además que el 92% por ciento de las cepas pertenecían a la especie *Serratia marcescens*. No se observó un aumento anual en la resistencia, a pesar de los informes de resistencia cada vez mayor entre estas especies reportados por otros grupos⁸³.

Aspectos patogénicos

Entre los aspectos de patogenia y virulencia de *S. marcescens* que han sido estudiados se incluyen: adherencia, hidrofobicidad, biosíntesis del lipopolisacárido (LPS) y productos extracelulares, captación de hierro y producción de hemolisinas.

La adhesión a las superficies epiteliales se daría a través de los *pili* tanto resistentes como sensibles a manosa.

El lipopolisacárido LPS es responsable de la actividad biológica de la endotoxina.

S. marcescens produce exoproteínas: quitinasa, lipasa, cloroperoxidasa, proteasas, lecitinasa y hemolisina, reconocidas como factores de virulencia, además de gelatinasa y DNasa^{2,55}.

La capacidad de producir proteasa alcalina y gelatinasa desempeñarían un papel importante en la patogénesis de la queratitis relacionada al uso de lentes de contacto.

En un trabajo de reciente publicación se analizó el proceso de invasión de este patógeno oportunista en células epiteliales y se demostró que una vez internalizada, *Serratia* escapa, no sólo de persistir, sino también de multiplicarse generando un nicho adecuado para la supervivencia y la proliferación dentro de la célula huésped⁴⁴.

S. marcescens también produce un *biofilm* que favorece la adhesividad a las superficies y que tiene características diferentes a los producidos por otros microorganismos como *P. aeruginosa* y *E. coli*.

Características culturales

Una característica cultural diferencial de varias especies es el desarrollo de colonias pigmentadas. *Serratia rubidaea* especialmente, *Serratia marcescens* (incluyendo la cepa Kred de *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis*) y cepas de *S. plymuthica* producen un pigmento rojo muy característico llamado prodigiosina, insoluble en agua, que puede aparecer a lo largo de toda la colonia o solo como un centro de color². El color varía de rojo oscuro a rosa pálido, dependiendo de la edad de las colonias. Su formación se ve favorecida por una incubación a 30°C en un medio de agar con glicerol.

La producción de prodigiosina está influenciada por la temperatura, la tensión de oxígeno, la concentración de fosfato (pH) e iones metálicos. La máxima producción del pigmento generalmente ocurre durante la fase estacionaria y la cantidad de pigmento en la bacteria alcanza su punto máximo después de 5 días de incubación.

Tanto las cepas de *Serratia marcescens* que producen pigmento como aquellas que son incapaces de sintetizar la prodigiosina, dan reacciones bioquímicamente idénticas.

En agar nutritivo las colonias tienen un diámetro de 1,5 a 2 mm después de 24 horas de incubación; en agar Agar Hektoen las colonias tienen a menudo un color salmón debido a la fermentación de la sacarosa. *Serratia marcescens* forma colonias lactosa negativas en el agar MacConkey y pueden ser β -hemolíticas en el agar sangre³⁵. Las hemolisinas son inestables después de la liberación, de modo que no siempre se detectan por las técnicas habituales.

Las temperaturas óptimas de desarrollo varían según las especies: 37°C para *S. ficaria*, *S. marcescens* y *S. odorifera* y de 22 a 30°C para las especies del grupo *liquefaciens*, *S. plymuthica* y *S. rubidaea*. *S. odorifera* produce un olor acre, similar al de las papas sin pelar.

En agar MuellerHinton, los cultivos de *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* y la mayoría de las cepas de otras especies crecen alrededor de discos de colistina, polimixina B y cefalotina y dan un aspecto de escarapela sugerente, pero no es totalmente específico de *Serratia* spp.

S. marcescens tiene predilección por el crecimiento en los alimentos con almidón, donde las colonias pigmentadas son fácilmente confundidas con gotas

de sangre. *S. marcescens* degrada el triptófano y usa citrato como fuente de carbono.

Identificación a nivel de género y especie

Las especies del género *Serratia* se distinguen entre las enterobacterias por producir tres enzimas hidrolíticas: lipasa, gelatinasa y DNasa. Los caracteres bioquímicos mínimos de las especies del género *Serratia* se resumen en la Tabla 14. Además, las especies de este género, excepto *S. fonticola*, pueden utilizar 4-aminobutirato, caprato, caprilato, L-fucosa y tirosina como única fuente de carbono. Los caracteres para diferenciar las especies del género *Serratia* se presentan en la Tabla 15. La mayoría de las especies se identifican fácilmente, excepto las del grupo *S. liquefaciens*. La separación de los miembros de este grupo se puede lograr utilizando una combinación de API 50 CH y API ZYM (bioMérieux, Hazelwood, MO, EE.UU.)^{55,71}, sistemas automatizados (Vitek o similar)^{109,110} o métodos moleculares²³. Se proponen dos algoritmos para facilitar la separación de las distintas especies del género *Serratia* partiendo de su comportamiento frente a los aminoácidos lisina y ornitina (Figura 1).

Tabla 14. Caracteres bioquímicos de las especies del género *Serratia*

Reacciones positivas	Reacciones negativas
ONPG	ADH (excepto <i>S. grimesii</i>)
Voges Proskauer (excepto <i>S. fonticola</i>)	Producción de SH ₂
DNasa (excepto <i>S. fonticola</i>)	Indol (excepto <i>S. odorifera</i>)
Lipasa (excepto <i>S. fonticola</i>)	Fenilalanina desaminasa

Gelatinasa(excepto *S. fonticola*)

Fermentación de dulcitol
(excepto *S. fonticola*)

Fermentación de glucosa, manitol, D-
manosa y trehalosa

^aONPG: o-nitrofenilgalactopiranosido, ^b ADH: arginina dihidrolasa.

Tabla 15.Caracterización de especies del género *Serratia*^{a, b}

ESPECIES	LDC	ODC	Mal	Ara	Ram	Xil	Sac	Ado	Sbl	Cel	Abl	Pig
<i>S. entomophila</i> ^c	-	-	-	-	-	v	+	-	-	-	V	-
<i>S. ficaria</i>	-	-	-	+	v	+	+		+	+	+	-
<i>S. fonticola</i>	+	+	v	+	v	v	v	+	+	-	+	-
<i>S. grupoliquefaciens</i>	+	+	-	+	v	+	+	-	+	-	-	-
<i>S. marcescens</i> subsp.marcescens	+	+	-	-	-	-	+		+	-	-	V
<i>S. marcescens</i> biogroup 1	v	+	-	-	-	-	+	V	+	-	-	ND
<i>S. odorifera</i> biogruppo 1 ^d	+	+	-	+	+	+	+	V	+	+	-	-
<i>S. odorifera</i> biogruppo 2 ^d	+	-	-	+	+	+	-	V	+	+	-	-
<i>S. plymuthica</i> ^e	-	-	-	+	-	+	+	-	V	V	-	+
<i>S. rubidaea</i>	v	-	+	+	-	+	+	-	+	V	ND	ND

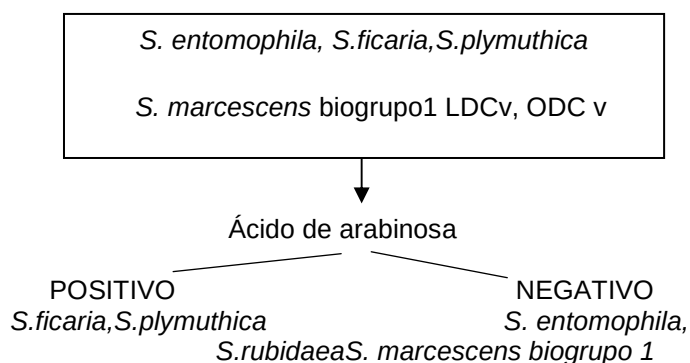
^a*S. marcescens* subsp. *sakuensis*, es un microorganismo formador de esporas; *S. ureolytica* es ureasa positiva(solo se conoce una única cepa).

^bAbreviaturas: LDC: lisina descarboxilasa, ODC: ornitina descarboxilasa, Mal: malonato, Ara: arabinosa, Ram: L-ramnosa; Xil: D-xilosa; Sac: sacarosa, Ado: adonitol, Sbl: sorbitol, Cel: celobiosa, Abl: D-arabitol, Pig: pigmento, +: ≥ 90%, V: 11 a 89%, -: ≤ 10%, ND: información no disponible.

^cCrece a 37°C, pero la caracterización bioquímica de be realizarse a 30°C.

^dpresentan un olor característico

^e puede no crecer a 37°C.



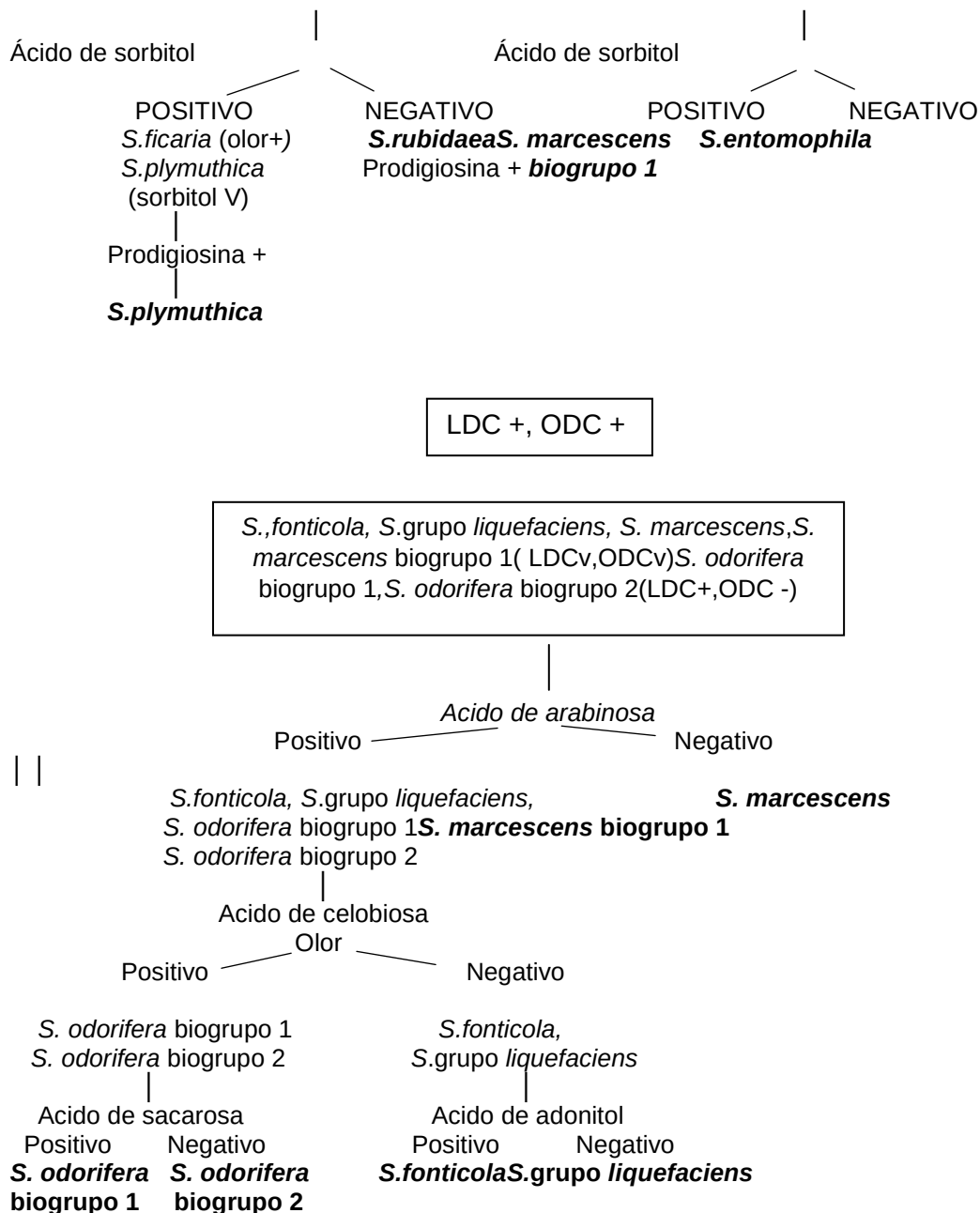


Figura 1. Algoritmos para la separación de las especies del género *Serratia* partiendo de su comportamiento frente a los aminoácidos lisina y ornitina

Identificación por métodos moleculares

La amplificación del gen del ARNr 16S permite identificar con precisión a *S. marcescens* mediante el uso de primers universales seguida de secuenciación. Para los demás integrantes del género *Serratia* puede alcanzarse una identificación correcta a nivel de especie mediante el empleo de

genes alternativos. La secuenciación de genes tales como *recA*, *rpoB*, *tuf*, *gyrA* y *gyrB*, entre otros, son de utilidad ya que permiten detectar una mayor variabilidad entre especies.

Para el estudio de brotes, se deben emplear técnicas moleculares que posean un alto poder de discriminación y sean de fácil interpretación. Varios métodos moleculares pueden utilizarse para la genotipificación. El método de referencia es la electroforesis en campo pulsado (PFGE).

Otros métodos de genotipificación basados en PCR (reacción en cadena de la polimerasa) son bastantes utilizados debido a su mayor versatilidad, entre ellos la amplificación aleatoria de ADN polimórfico o RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*).

Sensibilidad a los antibióticos

Serratia spp. presenta una β -lactamasa cromosómica inducible de tipo AmpC que le confiere resistencia natural a ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas de primera generación e inhibidores de β -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactama y tazobactama). Hay algunas excepciones, especialmente con sulbactama y tazobactama.

La resistencia a cefuroxima y cefoxitina es variable. *Serratia* spp. es más sensible a cefoxitina. *Serratia* posee además una resistencia intrínseca propia de especie a nitrofuranos, tetraciclinas y polipéptidos (polimixina y colistina), a excepción de *S. fonticola*.

Frente a los nitrofuranos, un cierto número de cepas pueden dar halos de inhibición pequeños en el antibiograma por difusión y un escaso número puede mostrar sensibilidad.

Serratia spp. al igual que *Enterobacter* spp. puede hiperproducir β -lactamasa cromosómica tipo de AmpC por desrepresión, mecanismo que es estable e irreversible, esté o no presente el antibiótico inductor. A este hecho se suma el aislamiento frecuente de cepas portadoras de β -lactamasas plasmídicas de espectro extendido (BLEE).

El reconocimiento de estos mecanismos, especialmente en cepas causales de infecciones graves, impacta directamente en la elección de la terapia antimicrobiana.

Las cefalosporinas de cuarta generación son una opción frente a cepas productoras de BLEE. Si además son productoras de AmpC deben emplearse carbapenemes.

S. marcescens posee una enzima cromosómica (AAC-6'), que cuando se hiperproduce puede dar resistencia a amicacina, netilmicina, tobramicina y kanamicina. No obstante puede presentar un fenotipo sensible *in vitro*.

En *S. marcescens* se observó resistencia a carbapenemes por presencia de metaloenzimas (IMP-1) y serinproteínas (Sme-1, IMI-1 y NCM-A). Las diferencias fenotípicas generales entre ambos grupos son: IMP-1 confiere niveles similares de resistencia para imipenem y meropenem, las serinproteínas afectan más a imipenem.

Las metaloenzimas no son inhibidas por ácido clavulánico y no actúan sobre aztreonam, droga que sí es hidrolizada por las serinproteínas.

Bibliografía

1. Albarado LS, Flores E, Mendoza G, Mundarain T. Asociación de *Klebsiella* spp., con síndrome diarreico agudo en niños de 0 a 2 años de edad. Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. 2007; 11 :1-6.
2. Albuquerque Menezes E, Coehlo Cezafar, de Sena Andrade MS, Abreu MV, de Paula Rocha A, Cunha F. Frequency of *Serratiasp.* in urine infections of intern patients in the Santa Casa de Misericórdia in Fortaleza. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2004; 37: 70-71.
3. Alves MS, da Silva Dias RC, Dias de Castro AC , Riley LW, Moreira BM. Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella* spp. J Clin Microbiol. 2006; 44 : 3640–6.
4. Anderson DJ, Richet H, Chen LF, Spelman DW, Hung YJ, Juang AT, Sexton DJ, Raoult D. Seasonal variation in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection on 4 continents. J Infect Dis. 2008; 197: 752–6.
5. Ayan M, Kuzucu C, Durmaz R, Aktas E, Cizmeci Z. Analysis of three outbreaks due to *Klebsiella* species in a neonatal intensive care unit. Infect Control Hosp Epidemiol. 2003; 24: 495-500.
6. Badenoch PR, Thom AL, Coster DJ. *Serratia ficaria* endophthalmitis. J Clin Microbiol. 2002; 40: 1563-4.
7. Batres Iglesias AP, Pérez Cabeza MI, del Río Pardo MJ, Castaño M. Primera manifestación oftalmológica de una sepsis por *Klebsiella*. Importancia de la sospecha diagnóstica precoz. Arch Soc Esp Oftalmol. 2011; 86: 412-4.
8. Bergman KA, Arends JP, Schölvink EH. *Pantoea agglomerans* septicemia in three newborn infants. Pediatr Infect Dis J. 2007; 26: 453-4.
9. Bezerra SM, Jardim MM, Silva VB. Granuloma inguinale (Donovanosis). An Bras Dermatol. 2011;86:585-6.
10. Bhadra B, Roy P, Chakraborty R. *Serratia ureilytica* sp. nov., a novel urea-utilizing species. Int J Syst Evol Microbiol. 2005; 55: 2155–8.

11. Bicudo EL, Macedo VO, Carrara MA, Castro FF, Rage RI. Nosocomial outbreak of *Pantoea agglomerans* in a pediatric urgent care center. *Braz J Infect Dis*. 2007; 11: 281-4.
 12. Blossom D, Noble-Wang J, Su J, Pur S, Chemaly R, Shams A, Jensen B, Pascoe N, Gullion J, Casey E, Hayden M, Arduino M, Budnitz DS, Raad I, Trenholme G, Srinivasan A, Serratia in Prefilled Syringes Investigation Team Group. Multistate outbreak of *Serratia marcescens* bloodstream infections caused by contamination of prefilled heparin and isotonic sodium chloride solution syringes. *Arch Intern Med*. 2009; 169:1705-11.
 13. Brady CL, Cleenwerck I, Venter SN, Engelbeen K, De Vos P, Coutinho TA. Emended description of the genus *Pantoea*, description of four species from human clinical samples, *Pantoea septica* sp. nov., *Pantoea eucrina* sp. nov., *Pantoea brenneri* sp. nov. and *Pantoea conspicua* sp. nov., and transfer of *Pectobacterium cypripedii* (Hori 1911) Brenner et al. 1973 emend. Hauben et al. 1998 to the genus as *Pantoea cypripedii* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010; 60: 2430-40.
 14. Brady C, Cleenwerck I, Venter S, Coutinho T, De Vos P. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. *Syst Appl Microbiol*. 2013; 36: 309-9.
 15. Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L, Grimont P. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario base on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One*. 2009; 4: e 4982.
 16. Brisse S, Grimont F, Grimont PAD. The genus *Klebsiella*. *Prokaryotes*. 2006; 6: 159–96.
-

17. Buffet-Bataillon S, Rabier V, Bétrémieux P, Beuchée A, Bauer M, Pladys P, Le Gall E, Cormier M, Jolivet-Gougeon A. Outbreak of *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit: contaminated unmedicated liquid soap and risk factors. J Hosp Infect. 2009; 72: 17-22.
18. Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompарт CM, Alberti S, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. Infect Immun. 2004; 72: 7107-14.
19. Caruntu FA, Benea L. Spontaneous bacterial peritonitis: pathogenesis, diagnosis, treatment. J Gastrointest Liver Dis. 2006; 15: 51-6.
20. Casellas JM. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. Rev Panam Salud Pública. 2011; 30: 519-28.
21. CDC Centers for Disease Control and Prevention. Multiplex real-time PCR detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) and New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1) genes. www.cdc.gov/HAI/.../KPC-NDM-protocol-2011.pdf.
22. Chang CM, Lu FH, Guo HR, Ko WC. *Klebsiella pneumoniae* fascial space infections of the head and neck in Taiwan: emphasis on diabetic patients and repetitive infections. J Infect. 2005; 50: 34-40.
23. Clinical and Laboratory Standards Institute. Interpretative criteria for identification of bacteria and fungi by DNA sequencing. Approved Guideline MM18-A 28 (12), 2009. CLSI, Wayne, Pennsylvania, EE.UU.
24. Cohen AL, Ridpath A, Noble-Wang J, Jensen B, Peterson AM, Arduino M, Jernigan D, Srinivasan A. Outbreak of *Serratia marcescens* bloodstream and central nervous system infections after interventional pain management procedures. Clin J Pain. 2008; 24: 374-80.
25. Cruz AT, Cazacu AC, Allen CH. *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. J Clin Microbiol. 2007; 45: 1989–92.
26. Dalben M, Varkulja G, Basso M, Krebs VL, Gibelli MA, van der Heijden I, Rossi F, Duboc G, Levin AS, Costa SF. Investigation of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in a neonatal unit and review of the literature. J Hosp Infect. 2008; 70: 7-14.
27. De Baere T, Verhelst R, Labit C, Verschraegen G, Wauters G, Claeys G, Vaneechoutte M. Bacteremic infection with *Pantoea ananatis*. J Clin Microbiol. 2004; 42: 4393–5.

28. de Boer MG, Brunsveld-Reinders AH, Salomons EM, Dijkshoorn L, Bernards AT, van den Berg PC, van den Broek PJ. Multifactorial origin of high incidence of *Serratia marcescens* in a cardio-thoracic ICU: analysis of risk factors and epidemiological characteristics. J Infect. 2008; 56: 446-53.
29. Delétoile A, Decré D, Courant S, Passet V, Audo J, Grimont P, Arlet G, Brisse S. Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. J Clin Microbiol. 2009; 47:2300-10.
30. de Pontual L, Ovetchkine P, Rodriguez D, Grant A, Puel A, Bustamante J, Plancoulaine S, Yona L, Lienhart PY, Dehesdin D, Huerre M, Tournebize R, Sansonetti P, Abel L, Casanova JL. Rhinoscleroma: a French national retrospective study of epidemiological and clinical features. Clin Infect Dis. 2008; 47: 1396-402.
31. Desimonia MC, Esquivel GP, Merino LA. Colonización fecal por cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en una Unidad Neonatal de Cuidados Intensivos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2004; 22: 507- 11.
32. Domínguez Berrot, AM, de San Luis González LC, Pascual Palacín R, Álvarez Ruíz A; López Messa JB, Tamayo Lomas LM. Absceso prostático como causa poco frecuente de *shock* séptico. Med Intensiva. 2004; 28: 222-4.
33. Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2001; 51(Pt 3):925-32.
34. Drudy D, Mullane NR, Quinn T, Wall PG, Fanning S. *Enterobacter sakazakii*: an emerging pathogen in powdered infant formula. Clin Infect Dis. 2006; 42: 996-1002.
35. Duarte I, Vargas A, Herrera JF, Moya T, Herrera M, Marin JP, Yock I, Herrera ML. *Serratia marcescens*. Análisis de 432 aislamientos. Rev Méd Hosp Nac Niños (Costa Rica). 2001; 36: 51-5.
-

36. Echeverri Toro LM, Cataño Correa JC. *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. *Iatreia*. 2010; 23: 240-9.
37. Eleman A, Rahimian J, Mandell W. Infection with panresistant *Klebsiella pneumoniae*: a report of 2 cases and brief review of the literature. *Clin Infect Dis*. 2009;49: 271–4.
38. El-Sharoud WM, O'Brien S, Negredo C, Iversen C, Fanning S, Healy B. Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products. *BMC Microbiology*. 2009, 9: 24.
39. Engel HJ, Collignon PJ, Whiting PT, Kennedy KJ, *Serratia* sp. bacteremia in Canberra, Australia: a population-based study over 10 years. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009; 28: 821-4.
40. Errecalde L, Cogut S, Erbín M, Jordá Vargas L, Cattani E, Posse T, Tutzer S, Hermes R, Kaufman S. CHROMagar KPC. Comparación con el método propuesto por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, EE.UU.) para el estudio de portación rectal y evaluación de falsos positivos. *Rev Argent Microbiol*. 2012; 44:89-93.
41. Fang CT, Chuang YP, Shun CT, Chang SC, Wang JT. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J Exp Med*. 2004; 199: 697-705.
42. Fang CT, Lai SY, Yi WC, Hsueh PR, Liu KL, Chang SC. *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: an emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess. *Clin Infect Dis*. 2007; 1; 45:284-93.
43. Fang FC, Sandler N, Libby SJ. Liver abscess caused by magA+ *Klebsiella pneumoniae* in North America. *J Clin Microbiol*. 2005; 43:991-2.
44. Fedrigo GV, Campoy EM, Di Venanzio G, Colombo MI, Garcia Vescovi E. *Serratia marcescens* able to survive and proliferate in autophagic-like vacuoles inside non-phagocytic cells. *PLoS ONE*. 2011; 6:1-15.
45. Fevre C, Passet V, Deletoile A, Barbe V, Frangeul L, Almeida AS, Sansonetti P, Tournebise R, Brisse S. PCR-based identification of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*, the agent of rhinoscleroma. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5:e1052.
46. Friedman ND, Kotsanas D, Brett J, Billah B, Korman TM. Investigation of an outbreak of *Serratia marcescens* in a neonatal unit via a case–control study and molecular typing. *Am J Infect Control*. 2008; 36: 22-8.

47. Friedman ND, Petersen NB, Sumner WT, Alexander BD. Spontaneous dermal abscesses and ulcers as a result of *Serratia marcescens*. J Am Acad Dermatol. 2003; 49: 193-4.
48. Friend JC, Hilligoss DM, Marquesen M, Ulrick J, Estwick T, Turner ML, Cowen EW, Anderson V, Holland SM, Malech HL. Skin ulcers and disseminated abscesses are characteristic of *Serratia marcescens* infection in older patients with chronic granulomatous disease. J Allergy Clin Immunol. 2009; 124: 4-166.
49. Galluzzo ML, Hernández C, Dávila MT, Pérez L, Oleastro M, Zelazko M, Rosenzweig SD. The clinical and histopathologic features and a unique spectrum of organisms significantly associated with chronic granulomatous disease in childhood osteomyelitis. Clin Infect Dis. 2008; 46: 745-9.
50. Gavini E, Mergaert J, Bejl A, Mielcarek C, Izard D, Kersters K, De Ley J. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1988) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1989; 39: 337–45.
51. Gómez S A, Pasterán F, Faccone D, Tijet N, Rapoport M, Lucero C, Lastovetska O, Albornoz E, Galas M, Melano RG, Corso A, Petroni A. KPC Group. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. Clin Microbiol Infect. 2011; 17: 1520-4.
52. Gorret J, Chevalier J, Gaschet A, Fraisse B, Violas P, Chapuis M, Jolivet-Gougeon A. Childhood delayed septic arthritis of the knee caused by *Serratia fonticola*. Knee. 2009; 16: 512-4.
53. Green, NM, Tran R, Janda JM. *Klebsiella* and gastrointestinal syndromes with particular emphasis on *Klebsiella oxytoca* antibiotic-associated colitis. Clin Microbiol Newsl. 2009; 31: 111–6.
54. Grimont F, Grimont PAD. The genus *Enterobacter*. Prokaryotes. 2006; 6: 197-214.
55. Grimont F, Grimont PAD. The genus *Serratia*. Prokaryotes. 2006; 6: 219-44.
-
56. Grimont PAD, Grimont F. Genus *Pantoea*. En: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editors, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., New York, Springer-Verlag, 2005; vol. 2: p. 713–20.

57. Habsah H, Zeehaida M, Van Rostenberghe H, Noraida R, Wan Pauzi WI, Fatimah I, Rosliza AR, Nik Sharimah NY, Maimunah H. An outbreak of *Pantoea* spp. in a neonatal intensive care unit secondary to contaminated parenteral nutrition. J Hosp Infect. 2005; 61: 213-8.
58. Hansen DS, Aucken HM, Abiola T, Podschun R. Recommended test panel for differentiation of *Klebsiella* species on the basis of a trilateral interlaboratory evaluation of 18 biochemical tests J Clin Microbiol. 2004, 42: 3665 -9.
59. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollack DA, Fridkin SK, for the National Healthcare Safety Network Team and Participating National Healthcare Safety Network Facilities. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. Infect Control Hosp Epidemiol. 2008; 29: 996–1011.
60. Hiremath S, Biyani M. Technique survival with *Serratia* peritonitis. Adv Perit Dial. 2006; 22: 73-6.
61. Hoffmann H, Stindl S, Ludwig W, Stumpf A, Mehlen A, Monget D, Pierand D, Ziesing S, Heesemann J, Roggenkamp A, Schleifer KH. *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* subsp. nov., *E. hormaechei* subsp. *hormaechei* comb. nov., and *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* subsp. nov., three new subspecies of clinical importance. J Clin Microbiol. 2005; 43: 3297–303.
62. Hoffmann H, Stindl S, Ludwig W, Stumpf A, Mehlen A, Heesemann J, Monget D, Schleifer KH, Roggenkamp A. Reassignment of *Enterobacter dissolvens* to *Enterobacter cloacae* as *E. cloacae* subspecies *dissolvens* comb. nov. and emended description of *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter kobei*. Syst Appl Microbiol. 2005; 28: 196 – 205.
63. Hoffmann H, Stindl S, Ludwig W, Stumpf A, Mehlen A, Monget D, Heesemann J, Schleifer KH, Roggenkamp A. Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. Syst Appl Microbiol. 2005; 28: 206–12.
64. Horcajada JP, Martínez JA, Alcón A, Marco F, De Lazzari E, de Matos A, Zaragoza M, Sallés M, Zavala E, Mensa J. Acquisition of multidrug-resistant *Serratia marcescens* by critically ill patients who consumed tap water during receipt of oral medication. Infect Control Hosp Epidemiol. 2006; 27: 774-7.

65. Hoyos-Orrego A, Rivera-Rivera O, Hoyos-Posada C, Mesa-Restrepo C, Alfaro-Velásquez J. Características clínicas, epidemiológicas y de susceptibilidad a los antibióticos en casos de bacteriemia por *Klebsiella pneumoniae* en neonatos. Rev CES Medicina. 2007; 21: 31-9.
66. Hsu CR, Lin TL, Chen YC, Chou HC, Wang JT. The role of *Klebsiella pneumoniae* *mpA* in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. Microbiology. 2011; 157(Pt 12): 3446-57.
67. Hunter CJ, Petrosyan M, Ford HR, Prasadarao NV. *Enterobacter sakazakii*: An emerging pathogen in infants and neonates. Surg Infect. 2008; 9: 533–9.
68. Iversen C, Mullane N, Mc Cardelli B, Tall BD, Lehner A, Fanning S, Stephan R, Joosten H. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonicus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov., and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. Int J Syst Evol Bacteriol. 2008; 58:1442–7.
69. Iversen C, Lehner A, Mullane N, Marugg J, Fanning S, Stephan R, Joosten H. Identification of "*Cronobacter*" spp. (*Enterobacter sakazakii*). J Clin Microbiol. 2007; 45: 3814-6.
70. Janda JM. New members of the family *Enterobacteriaceae*. En: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, editors. The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria, 3rd ed. New York, NY, Springer-Verlag, 2006, p. 5–40.
71. Janda JM, Abbott SL. The Enterobacteria, 2nd ed. Washington DC, USA, ASM Press, 2006.
72. Janda JM, Abbott SL. The genera *Klebsiella* and *Raoultella*. The Enterobacteria, 2nd ed. Washington, USA: ASM Press 2006, p. 115-29.
73. Kampfer P, Ruppel S, Remus R. *Enterobacter radicincitans* sp. nov., a plant growth promoting species of the family *Enterobacteriaceae*. Syst Appl Microbiol. 2005; 28: 213–21.

74. Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Oh MD, Kim EC, Choe KW. Bloodstream infections caused by *Enterobacter* species: predictors of 30-day mortality rate and impact of broad-spectrum cephalosporin resistance on outcome. *Clin Infect Dis*. 2004; 39: 812-8.
75. Keynan Y, Rubinstein E. Endogenous endophthalmitis caused by hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*: an emerging disease in Southeast Asia and beyond. *Curr Infect Dis Rep*. 2008; 10: 343-5.
76. Kostina E, Ofek I, Crouch E, Friedman R, Sirota L, Klinger G, Sahly H, Keisari Y. Noncapsulated *Klebsiella pneumoniae* bearing mannose-containing O antigens is rapidly eradicated from mouse lung and triggers cytokine production by macrophages following opsonization with surfactant protein D. *Infect Immun*. 2005; 73: 8282-90.
77. Kotewicz ML, Tall BD. Optical maps of subgroups of *Cronobacter* (formerly *Enterobacter sakazakii*) show large chromosomal regions of homology and differences among isolates. First International Conference on *Cronobacter*, 2009, Poster Abstract 60, Dublin, Ireland.
78. Krzysińska S, Koczura R, Mokracka J, Puton T, Kaznowski A. Isolates of the *Enterobacter cloacae* complex induce apoptosis of human intestinal epithelial cells. *Microb Pathog*. 2010; 49: 83-9.
79. Kucerova E, Clifton SW, Xia XQ, Long F, Porwollik S, Fulton L, Fronick C, Minx P, Kyung K, Warren W, Fulton R, Feng D, Wollam A, Shah N, Bhonagiri V, Nash WE, Hallsworth-Pepin K, Wilson RK, McClelland M, Forsythe SJ. Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species. *PLoS One*. 2010; 5: e9556.
80. Kuhnert P, Korczak BM, Stephan R, Joosten H, Iversen C. Phylogeny and whole genome DNA-DNA similarity of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) and related species by multilocus sequence analysis (MLSA). *Int J Food Microbiol*. 2009; 136: 152-8.
81. Lalas KM, Erichsen D. Sporadic *Pantoea agglomerans* bacteremia in a near-term female: case report and review of literature. *Jpn J Infect Dis*. 2010; 63: 290-1.
82. Larson EL, Cimiotti JP, Haas J, Nesin M, Allen A, Della-Latta P, Saiman L. Gram-negative bacilli associated with catheter-associated and non-catheter-associated bloodstream infections and hand carriage by healthcare workers in neonatal intensive care units. *Pediatr Crit Care Med*. 2005; 6: 457-61.

83. Laupland KB, Parkins MD, Gregson DB, Church DL, Ross T, Pitout JD. Population-based laboratory surveillance for *Serratia* species isolated from a large Canadian health region. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008; 27: 89-95.
84. Lavender H, Jagnow JJ, Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbria-mediated immunity to infection in the murine model of respiratory disease. *Int J Med Microbiol.* 2005; 295: 153-9.
85. Lawlor MS, Hsu J, Rick PD, Miller VL. Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. *Mol Microbiol.* 2005; 58: 1054-73.
86. Lederman ER, Crum NF. Pyogenic liver abscess with a focus on *Klebsiella pneumoniae* as a primary pathogen: an emerging disease with unique clinical characteristics. *Am J Gastroenterol.* 2005; 100: 322-31.
87. Lee J, Carey J, Perlman DC. Pneumonia and bacteremia due to *Serratia odorifera*. *J Infect.* 2006; 53: 212-4.
88. Lehner A, Stephan R. Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. *J Food Prot.* 2004; 67: 2850-7.
89. Li X, Zhang D, Chen F, Ma J, Dong Y, Zhang L. *Klebsiella singaporensis* sp. nov., a novel isomaltulose-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004; 54: 2131-6.
90. Liberto MC, Matera G, Puccio R, Lo Russo T, Colosimo E, Focà E. Six cases of sepsis caused by *Pantoea agglomerans* in a teaching hospital. *New Microbiol.* 2009; 32: 119-23.
91. Lim PS, Chen SL, Tsai CY, Pai MA. *Pantoea* peritonitis in a patient receiving chronic ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrology (Carlton).* 2006; 11: 97-9.
92. Lin YT, Der Wang F, Wu PF, Fung CP. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in diabetic patients: association of glycemic control with the clinical characteristics. *BMC Infect Dis.* 2013; 13: 56
93. Lin YT, Jeng YY, Chen TL, Fung CP. Bacteremic community-acquired pneumonia due to *Klebsiella pneumoniae*: clinical and microbiological characteristics in Taiwan, 2001-2008. *BMC Infect Dis.* 2010; 10: 307.
94. MacFaddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica 3ª edición., Buenos Aires, Argentina, Editorial Médica Panamericana SA., 2003.

95. Martínez F, Gómez S, Rodríguez P, Páez J, Urbina G, Ortiz B. *Klebsiella pneumoniae* y *K. oxytoca* aisladas de niños con diarrea. adherencia y citotoxicidad en líneas celulares. RevSocVen Microbiol. 2005; 25: 100-4.
96. Martínez J, Martínez L, Rosenblueth M, Silva J, Martínez-Romero E. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. Int Microbiol. 2004; 7: 261-8.
97. Mayer CW, Bangash S, Bocchini JA Jr, Lowery-Nordberg M, Bahna SL. *Serratia marcescens* osteomyelitis in an infant. Allergy Asthma Proc. 2006; 27: 544-8.
98. Mohan Nair MK, Venkitanarayanan K. Role of bacterial OmpA and host cytoskeleton in the invasion of human intestinal epithelial cells by *Enterobacter sakazakii*. Pediatr Res. 2007; 62: 664-9.
99. Mokracka J, Koczura R, Pawlowski K, Kaznowski A. Resistance patterns and integron cassette arrays of *Enterobacter cloacae* complex strains of human origin. J Med Microbiol. 2011; 60: 737-43.
100. Morand PC, Billoet A, Rottman M, Sivadon-Tardy V, Eyrolle L, Jeanne L, Tazi A, Anract P, Courpiéd JP, Poyart C, Dumaine V. Specific distribution within the *Enterobacter cloacae* complex of strains isolated from infected orthopedic implants. J Clin Microbiol. 2009; 47: 2489-95.
- 100a. Müller A, Hächler H, Stephan R, Lehner A. Presence of AmpC beta-lactamases, CSA-1, CSA-2, CMA-1, and CMA-2 conferring an unusual resistance phenotype in *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus*. Microb Drug Resist. 2014;20:275-8.
101. Muñoz G, Alio JL, Pérez Santonja JJ, Artola A, Abad JL. Ulcerative keratitis caused by *Serratia marcescens* after laser in situ keratomileusis. J Cataract Refract Surg. 2004; 30: 507-12.
102. Naha K, Ramamoorthi, Prabhu M. Spontaneous septicaemia with multi-organ dysfunction- a new face for *Pantoea agglomerans*. Asian Pac J Trop Med. 2012;5: 83-4.
103. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009. Am J Infect Control. 2010; 38: 95-106.

104. Nicola FG, Nievas J, Smayevsky J. Evaluación de diversos métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas KPC en *Klebsiella pneumoniae*. Rev Argent Microbiol. 2012;44 : 290-302.
105. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis. 2011; 17: 1791–8.
106. Nordmann P, Poirel L, Carrère A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers? J Clin Microbiol. 2011; 49: 718–21.
107. Ocaña Carrizo AV, Rocchi M, Gasparotto A, Contrero I, Navarro M, Factorovich S, Albrecht C, Monterisi A. Bacteriemia por enterobacterias en adultos en un hospital universitario: análisis de cinco años. Rev Argent Microbiol. 2007; 39: 38-43.
108. O'Farrell N, Moi H. European guideline for the management of donovanosis. Int J STD AIDS. 2010; 21: 609-10.
109. O'Hara CM. Manual and automated instrumentation for identification of *Enterobacteriaceae* and other aerobic gram-negative bacilli. Clin Microbiol Rev. 2005; 18: 147–62.
110. O'Hara CM. Evaluation of the Phoenix 100 ID/AST system and NID panel for identification of *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, and commonly isolated nonenteric gram-negative bacilli. J Clin Microbiol. 2006; 44: 928-33.
111. Paauw A, Caspers MP, Leverstein-van Hall MA, Schuren FH, Montijn RC, Verhoef J, Fluit C. Identification of resistance and virulence factors in an epidemic *Enterobacter hormaechei* outbreak strain. Microbiology. 2009; 155 (Pt 5):1478-88.
112. Pagotto FJ, Nazarowec-White M, Bidawid S, Farber JM. *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo. J Food Prot. 2003; 66: 370-5.
113. Pagotto F. The type species is *Cronobacter sakazakii*. Palcich G, de Moraes Gillio C, Aragon-Alegro LC, Pagotto FJ, MacLean JM, Pagotto LL, Farber F, Perry JM. 2009. www.hc-sc.gc.ca Research Bureau of Microbial Hazards, Health Canada. <http://www.hc-sc.gc.ca/sr-sr/activ/micro/crono-eng.php> Date Modified: 2011-02-28.
114. Pasterán F, Lucero C, Soloaga R, Rapoport M, Corso A. Can we use imipenem and meropenem Vitek 2 MICs for detection of suspected KPC and other carbapenemase producers among species of *Enterobacteriaceae*? J Clin Microbiol. 2011; 49: 697–701.

115. Pasterán F, Albornoz E, Faccone D, Gómez S, Valenzuela C, Morales M, Estrada P, Valenzuela L, Matheu J, Guerriero L, Arbizú E, Calderón Y, Ramon-Pardo P, Corso A. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. J Antimicrob Chemother. 2012;67:1795-7.
116. Pasterán F, Méndez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol. 2009; 47: 1631-9.
117. Pasterán F, Méndez T, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Controlling false-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class A carbapenemase in species of *Enterobacteriaceae* by incorporating boronic acid. J Clin Microbiol. 2010; 48:1323–32.
118. Pasterán F G, Otaegui L, Guerriero L, Radice G, Maggiora R, Rapoport M, Faccone D, Di martino A, Galas M. *Klebsiella pneumoniae*-carbapenemase 2, Buenos Aires, Argentina. Emerg Infect Dis. 2008; 14: 1178-80.
119. Pasterán FG, Véliz O, Ceriana P, Lucero C, Rapoport M, Albornoz E, Gómez S, Corso A, ReLAVRANetwork Group. Evaluation of the blue-carba test for rapid detection of carbapenemases in gram-negative bacilli. J Clin Microbiol. 2015; 53:1996-8.
120. Patel JB, Rasheed JK, Kitchel B. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: activity, epidemiology, and laboratory detection. Clin Microbiol Newsl. 2009; 31: 55–62.
121. Pathengay A, Trehan HS, Mathai A, Jalali S, Majji AB, Das MK, Sharma S, Das T. *Enterobacter* endophthalmitis: clinicomicrobiologic profile and outcomes. Retina. 2012; 32: 558-62.
122. Persichino J, Tran R, Sutjita M, Kim D. *Klebsiella pneumoniae* necrotizing fasciitis in a Latin American male. J Med Microbiol. 2012; 61: 1614-6.
123. Pinna A, Usai D, Sechi LA, Carta A, Zanetti S. Detection of virulence factors in *Serratia* strains isolated from contact lens-associated corneal ulcers. Acta Ophthalmol. 2011; 89:382-7.
124. Pomakova DK, Hsiao CB, Beanan JM, Olson R, Mac Donald U, Keynan Y, Russo TA. Clinical and phenotypic differences between classic and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* an emerging and under-recognized pathogenic variant. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012; 31: 981-9.

125. Pozzi N, Nastro M, Achinelli F, Foccoli M, RodríguezC, Famiglietti A, Vay C, de GregorioS, Lasala M. Mortalidad asociada a infecciones por enterobacterias productoras de carbapenemasas. XIII Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología 2013, poster N° 68 posterselectronicos.com/.../6346a6e2-a228-4505-b4bf-ca07ede1f8d. Mar del Plata, Argentina.
126. Rahimian J, Wilson T, Oram V, Holzman RS. Pyogenic liver abscess: recent trends in etiology and mortality. *Clin Infect Dis*. 2004; 39: 1654–9.
127. Rezzonico F, Smits THM, Montesinos E, Frey JE, Duffy B. Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains. *BMC Microbiol*. 2009; 9: 204-9.
128. Rosenblueth M, Martínez M, Martínez L, Silva J, Martínez-Romero E. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Syst Appl Microbiol*. 2004; 27: 27–35.
129. Ronveaux O, de Gheldre Y, Glupczynski Y, Struelens M, de Mol P. Emergence of *Enterobacter aerogenes* as a major antibiotic-resistant nosocomial pathogen in Belgian hospitals *Clin Microbiol Infect*. 2008; 5: 622–7.
130. Samra Z, Bahar J, Madar-Shapiro L, Aziz N, Israel S, Bishara J. Evaluation of CHROMagar KPC for rapid detection of carbapenem-producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 3110–1.
131. Sarma PS. *Klebsiella ozaenae* splenic abscess following odontogenic infection in a girl with sickle cell disease. *Int J Infect Dis*. 2007; 11: 86-7.
132. Schembri MA, Blom J, Krogfelt KA, Klemm P. Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*. 2005; 73: 4626–33.
133. Sekhsokh Y, Arsalane L, El Ouenass M, Doublali T, Bajjou T, Lahlou Amine I. *Serratia rubidaea* bacteremia. *Med Mal Infect*. 2007; 37: 287-9.
134. Shubov A, Jagannathan P, Chin-Hong PV. *Pantoea agglomerans* pneumonia in a heart-lung transplant recipient: case report and a review of an emerging pathogen in immunocompromised hosts. *Transpl Infect Dis*. 2011; 13: 536-9.
135. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, Kallen A, Limbago B, Fridkin S; National Healthcare Safety Network (NHSN) Team and Participating NHSN Facilities. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013; 34:1-14.

136. Soria X, Bielsa I, Ribera M, Herrero MJ, Domingo H, Carrascosa JM, Ferrándiz C. Acute skin abscesses caused by *Serratia marcescens*. J Am Acad Dermatol. 2008; 58: 891-3.
137. Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kämpfer P, Maiden MC, Nesme X, Rosselló-Mora R, Swings J, Trüper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. Int J Syst Evol Microbiol. 2002; 52:1043-7.
138. Stephan R, Grim CJ, Gopinath GR, Mammel M, Sathhyamoorthy V, Trach LH, Chase HR, Fanning S, Tall BD. Re-examination of the taxonomic status of *Enterobacter helveticus*, *Enterobacter pulveris* and *Enterobacter turicensis* as members of the genus *Cronobacter* and their reclassification in the genera *Franconibacter* gen. nov. and *Siccibacter* gen. nov. as *Franconibacter helveticus* comb. nov., *Franconibacter pulveris* comb. nov. and *Siccibacter turicensis* comb. nov., respectively. Int J Syst Evol Microbiol. 2014; 64(Pt 10): 3402-10.
139. Stephan R, Lehner A, Tischler P, Rattei T. Complete genome sequence of *Cronobacter turicensis* LMG 23827, a food-borne pathogen causing deaths in neonates. J Bacteriol. 2011; 193: 309-10.
140. Stephan R, Van Trappen S, Cleenwerck I, Iversen C, Joosten H, De Vos P, Lehner A. *Enterobacter pulveris* sp. nov., isolated from fruit powder, infant formula and an infant formula production environment. Int J Syst Evol Microbiol. 2008; 58: 237-41.
141. Stephan R, Van Trappen S, Cleenwerck I, Vancanneyt M, De Vos P, Lehner A. *Enterobacter turicensis* sp. nov. and *Enterobacter helveticus* sp. nov., isolated from fruit powder. Int J Syst Evol Microbiol. 2007; 57: 820-6.
142. Sundin DR. Hidden beta-lactamases in the *Enterobacteriaceae*—dropping the extra disks for detection. Part I. Clin Microbiol Newsl. 2009 31: 41-4.
143. Sundin, D. R. Hidden beta-lactamases in the *Enterobacteriaceae*—dropping the extra disks for detection. Part II. Clin Microbiol Newsl. 2009; 31: 47-52.
144. Sunenshine RH, Tan ET, Terashita DM, Jensen BJ, Kacica MA, Sickbert-Bennett EE, Noble-Wang JA, Palmieri MJ, Bopp DJ, Jernigan DB, Kazakova S, Bresnitz EA, Tan CG, McDonald LC. A multistate outbreak of *Serratia marcescens* bloodstream infection associated with contaminated intravenous magnesium sulfate from a compounding pharmacy. Clin Infect Dis. 2007; 45: 527-33.

145. Swenson JM, Patel JB, Jorgensen JH. Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance. En: Murray, PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of Clinical Microbiology, 10th edition. Washington DC, EE.UU, ASM Press, 2011, p.1155-79.
146. Togneri AM, Gómez SA, Podestá LB, Pérez MP, Faccone DF, Ríos LE, Gañete MA, Anchordoqui MS, Pasterán FG, Corso AC. Diseminación de *bla*IMP-8 en enterobacterias aisladas en un hospital de Buenos Aires. Rev Argent Microbiol. 2013; 45: 104-9.
147. Townsend S, Hurrell E, Forsythe S. Virulence studies of *Enterobacter sakazakii* isolates associated with a neonatal intensive care unit outbreak. BMC Microbiol. 2008; 8: 64
148. Van Rostenberghe H, Noraida R, Wan Pauzi WI, Habsah H, Zeehaida M, Rosliza AR, Fatimah I, Nik Sharimah NY, Maimunah H. The clinical picture of neonatal infection with *Pantoea* species. Jpn J Infect Dis. 2006; 59: 120-1.
149. Velho PE, Souza EM, Belda Junior W. Donovanosis. Braz J Infect Dis. 2008; 12: 521-5.
150. Walckenaer E, Poirel L, Leflon-Guibout V, Nordmann P, Nicolas-Chanoine MH. Genetic and biochemical characterization of the chromosomal class A β -lactamases of *Raoultella* (formerly *Klebsiella*) *planticola* and *Raoultella* *ornithinolytica*. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48: 305–12.
151. Watson JT, Jones RC, Siston AM, Fernandez JR, Martin K, Beck E, Sokalski S, Jensen BJ, Arduino MJ, Srinivasan A, Gerber SI. Outbreak of catheter-associated *Klebsiella oxytoca* and *Enterobacter cloacae* bloodstream infections in an oncology chemotherapy center. Arch Intern Med. 2005; 165: 2639-43
152. Wu MF, Yang CY, Lin TL, Wang JT, Yang FL, Wu SH, Hu BS, Chou TY, Tsai MD, Lin CH, Hsieh SL. Humoral immunity against capsule polysaccharide protects the host from magA+ *Klebsiella pneumoniae*-induced lethal disease by evading toll-like receptor 4 signaling. Infect Immun. 2009; 77: 615-21.
153. Yan Q, Condell O, Power K, Butler F, Tall BD, Fanning S. *Cronobacter* species (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium. J Appl Microbiol. 2012; 113: 1-15.

154. Yan Q, Fanning S. Strategies for the identification and tracking of *Cronobacter* species: an opportunistic pathogen of concern to neonatal health. *Front Pediatr*. 2015; 3:38. doi: 10.3389/fped.2015.00038.
155. Yang CC, Yen CH, Ho MW, Wang JH. Comparison of pyogenic liver abscess caused by non-*Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Microbiol Immunol Infect*. 2004; 37: 176-84.
156. Ye Y, Li JB, Ye DQ, Jiang ZJ. *Enterobacter* bacteremia: Clinical features, risk factors for multiresistance and mortality in a Chinese University Hospital. *Infection*. 2006; 34: 252-7.
157. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee CC, Lai CC, Chuang YC. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008; 62:1–6.
158. Yu VL, Hansen DS, Ko WC, Sagnimeni A, Klugman KP, Wagener MM, Benedi VJ. Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13: 986 -93.
159. Zhang CX, Yang SY, Xu MX, Sun J, Liu H, Liu JR, Liu H, Kan F, Sun J, Lai R, Zhang KY. *Serratia nematodiphila* sp. nov., associated symbiotically with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditoides chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009; 59: 1603–8.
160. Zollner-Schwetz I, Högenauer C, Joainig M, Weberhofer P, Gorkiewicz G, Valentin T, Hinterleitner TA, Krause R. Role of *Klebsiella oxytoca* in antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis*. 2008; 47: 74-8.

Capítulo II.c.1.4

Salmonella, Edwardsiella, Citrobacter

MARÍA INÉS CAFFER

Jefa del Servicio Enterobacterias del Departamento Bacteriología del I.N.E.I. –
A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”

CELESTE LUCERO

Profesional del Servicio Antimicrobianos del Departamento Bacteriología del
I.N.E.I. – A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”

MARIANA PICHEL

Ex Profesional del Servicio Enterobacterias del Departamento Bacteriología del
I.N.E.I. – A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”

Salmonella

Aspectos taxonómicos

A través de los años el género *Salmonella* fue objeto de sucesivas modificaciones en lo que respecta a su taxonomía y nomenclatura. Sin embargo, todavía se siguen usando muchos de los métodos descritos y desarrollados por Edwards y Ewing en la década de los cuarenta¹⁵.

Hasta 1970 la taxonomía se basaba únicamente en el estudio de las propiedades bioquímicas convencionales y de las características antigénicas. Posteriormente, Le Minor y Popoff, en la década de los 80 propusieron cambios no solo en la nomenclatura de las especies del género, sino que también solicitaban que se tuvieran en cuenta las nuevas interpretaciones taxonómicas propuestas, basadas en estudios de hibridación del ADN²⁶.

Los métodos moleculares demostraron que el género *Salmonella* estaba constituido por dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* (V). *S. enterica* está compuesta por 6 subespecies: *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica*

subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV) y *S. enterica* subsp. *indica* (VI) ⁶⁰. A su vez, las subespecies de *S. enterica* y la especie *S. bongori* tienen propiedades bioquímicas distintas, que permiten diferenciarlas entre sí (Tabla 1).

La especie tipo es *S. enterica*. Las subespecies de *S. enterica* y la especie *S. bongori* se dividen en más de 2.500 serovariedades, que están definidas en función de diferentes asociaciones de factores antigénicos somáticos (O) y flagelares (H). La mayoría de las serovariedades, que constituyen más del 99,5 % de los aislamientos del hombre y de los animales de sangre caliente, pertenecen a *S. enterica* subsp. *enterica* (I) y llevan un nombre, por lo general, relacionado con el lugar geográfico donde se la aisló por primera vez.

Tabla 1. Propiedades bioquímicas diferenciales de las especies y subespecies de *Salmonella*

Pruebas bioquímicas	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	<i>S. bongori</i> (V)
Dulcitol	+ ^a	+	- ^b	-	-	d ^c	+
ONPG	-	-	+	+	-	d	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Gelatina	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
KCN	-	-	-	-	+	-	+
L(+) tartrato	+	-	-	-	-	-	-
Mucato	+	+	+	- (70%)	-	+	+

Salicina	-	-	-	-	+	-	-
Lactosa	-	-	- (75%)	+ (75%)	-	d	-
Habitat de la mayoría de las cepas	Animales de sangre caliente Animales de sangre fría y medio ambiente						

^a + : 90% o más de los resultados positivos, ^b - : 90% o más de los resultados negativos^c d: diferentes reacciones

Dado que las serovariedades no tienen nivel taxonómico de especie, sus nombres, escapan al dominio del “Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana”, por ello no deben escribirse en cursiva y la letra inicial va con mayúscula, de la siguiente manera: *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, o *S. enterica* serovar Typhimurium o *S. ser. Typhimurium* o *S. Typhimurium*.

Las serovariedades pertenecientes a las restantes subespecies y a *S. bongori*, de baja incidencia en patología humana o animal, se designan con el nombre de la subespecie, seguido de la fórmula antigénica, por ej.: *S. subsp. IV 50: b : - (S. enterica subsp. houtenae 50 : b : -)*².

Los nombres de las serovariedades están condensados en el esquema de White-Kauffmann-Le Minor, publicado por el Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de Referencia e Investigación de *Salmonella*, del Instituto Pasteur, de París, Francia²¹.

Hábitat

Los miembros del género *Salmonella* están ampliamente distribuidos en la naturaleza, se los encuentra como comensales y como patógenos en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos, causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre y en los animales.

Desde el punto de vista epidemiológico se pueden clasificar en tres grupos:

a) Los que no tienen preferencia por algún huésped en especial, por lo que infectan tanto al hombre como a los animales. En este grupo se encuentran la mayoría de las serovariedades responsables de las salmonelosis.

b) Los que infectan sólo al hombre: *S. enterica* serovar Typhi, *S. enterica* serovar Paratyphi A y *S. enterica* serovar Paratyphi C.

c) Los que están adaptados a un huésped animal: *S. enterica* serovar Abortusovis, a los ovinos, *S. enterica* serovar Abortusequi, a los equinos y *S. enterica* serovar Gallinarum, a las aves²⁰.

Significado clínico

Los miembros del género *Salmonella* son causantes de las siguientes patologías:

Salmonelosis

La salmonelosis es una zoonosis de distribución mundial. Se notifica con mayor frecuencia en los países desarrollados, ya que poseen mejores sistemas de notificación. Es una enfermedad de origen alimentario, porque los alimentos contaminados constituyen el principal modo de transmisión.

Desde el punto de vista epidemiológico, las infecciones por *Salmonella* pueden causar brotes en la población en general, sin embargo el 60-80 % de los casos son esporádicos. A veces se producen grandes brotes en hospitales, jardines maternos, geriátricos y restaurantes.

Se transmite al hombre ya sea directamente o a través de productos contaminados de origen animal, tales como: huevos crudos o parcialmente cocidos y sus productos, carnes y sus derivados, aves de corral (especialmente pollo y pavo), leche cruda, productos lácteos y agua contaminada. Los animales de granja se infectan a través de sus alimentos y de fertilizantes elaborados con harinas de carne, de pescado y de huesos contaminados. También se informaron brotes por el consumo de frutas, jugo de frutas y hortalizas crudas contaminadas. Otra fuente de contaminación son las mascotas (perros, gatos, caballos, pájaros, tortugas, iguanas y pájaros) y los productos farmacéuticos de origen animal no esterilizados (polvo de tiroides, hormonas pancreáticas, sustancias corticoadrenales, etc.). Es también importante la transmisión de persona a persona por la vía fecal-oral, en especial cuando existe diarrea.

La transmisión que oscila entre varios días a varias semanas, ocurre durante toda la evolución de la infección. El estado de portador temporal puede persistir varias semanas, especialmente en lactantes y es raro el de portador crónico (de más de un año).

Los síntomas son: gastroenteritis aguda, cefalalgia, dolores abdominales súbitos, diarrea, náuseas, fiebre y vómitos. La deshidratación puede ser grave sobre todo en menores de un año, ancianos e inmunocomprometidos. Aunque la morbilidad por salmonelosis es elevada, la mortalidad es baja, excepto, en niños de corta edad, ancianos e inmunosuprimidos. A veces el agente se localiza en cualquier tejido del cuerpo, produciendo abscesos y causando artritis, colecistitis, endocarditis, meningitis, pericarditis, neumonía, pioderma o pielonefritis. La infección que comienza con una diarrea aguda puede continuar

hacia una infección focal o hacia una septicemia. Tiene un período de incubación de 6 a 72 h, generalmente entre 12 a 36 h y la gastroenteritis persiste de 24 a 72 h. La dosis infectiva es de 10^5 a 10^8 microorganismos⁸.

Síndrome de fiebre entérica

Este síndrome está asociado con *S. enterica* serovar Typhi (fiebre tifoidea); *S. enterica* serovar Paratyphi A, *S. enterica* serovar Paratyphi C y *S. enterica* serovar Paratyphi B (fiebre paratifoidea). Los tres primeros microorganismos son patógenos exclusivos del hombre y *S. enterica* serovar Paratyphi B, puede encontrarse también en animales. La relación entre los casos de fiebre tifoidea y paratifoidea es 10:1, según informes de la OMS.

Se transmite por la ingestión de agua o de alimentos contaminados con heces u orina de enfermos o portadores. En algunos países, los mariscos, en especial, las ostras, son importantes vehículos de transmisión. También lo son las frutas y las verduras contaminadas con aguas residuales, los enfermos no diagnosticados y los portadores crónicos.

La transmisión oscila desde la primera semana de la enfermedad hasta el final de la convalecencia; después es variable. Cerca del 10 % de los pacientes con fiebre tifoidea no tratados, excretan *S. enterica* serovar Typhi, durante 3 meses después del inicio de los síntomas y del 2 al 5 % se convierten en portadores crónicos¹¹.

Los síntomas, en la fiebre tifoidea son: un cuadro febril prolongado (temperatura muy elevada) con signos de septicemia, cefalea intensa, malestar general, anorexia, bradicardia relativa, compromiso del tejido linfático y

estreñimiento. Estos síntomas son más frecuentes que la diarrea en los adultos. El cuadro clínico varía desde un padecimiento benigno con febrícula, hasta una afección grave con molestia abdominal y numerosas complicaciones, tales como, hemorragia y perforación intestinal, estado tóxico confusional, miocarditis, complicaciones supurativas y con menor frecuencia meningitis; de ahí, la importancia de diagnosticar los agentes causales con certeza y rapidez.

La fiebre paratifoidea, presenta un cuadro clínico similar, pero tiende a ser más benigna y su tasa de letalidad es mucho menor.

El período de incubación de la fiebre tifoidea es de 1 a 2 semanas, con un rango de 3 a 60 días, dependiendo de la magnitud del inóculo y de los factores del huésped. La dosis infectiva es baja, menor de 10^3 microorganismos. El estado de portador crónico es frecuente⁴².

Aspectos patogénicos

Salmonelosis

La mayoría de las serovariedades de *Salmonella* al ser ingeridas oralmente, debe atravesar la barrera ácida del estómago. Si bien sobreviven poco a pH menor de 1,5, que es el pH normal gástrico, lo hacen bien a pH 4 o mayor. A su vez poseen una respuesta adaptativa a la tolerancia ácida, que puede promover la sobrevivencia a pH bajos³⁶.

Una vez que abandonan el estómago, estos microorganismos móviles, entran en el intestino delgado, donde interactúan con la pared intestinal. Allí,

deben atravesar la capa de mucus que recubre la pared intestinal y evadir los productos secretorios del intestino, del páncreas y de la vesícula biliar, incluyendo enzimas pancreáticas y sales biliares.

Además, también deben eludir la acción de péptidos catiónicos que poseen propiedades antimicrobianas. Estos péptidos son secretados por gránulos contenidos en las células de Paneth, de las criptas del intestino delgado y representan una importante segunda línea de defensa, ya que los mismos tienen por función permeabilizar las membranas bacterianas.

La inmunoglobulina A (IgA) secretoria y el mucus intestinal, juegan un rol importante en la prevención de la penetración de la bacteria a los enterocitos que limitan la pared intestinal.

La próxima etapa en el proceso de la enfermedad, es la penetración del epitelio intestinal por el microorganismo. Con observaciones de microscopía electrónica, se reveló que las serovariedades invasivas interactúan con la cripta de la microvellosidad de las células epiteliales (Figura 1), de ese modo interrumpen el ribete en cepillo. Una vez que estas células son penetradas, la bacteria es incluida en vacuolas dentro del citoplasma de la célula huésped. Las cepas virulentas sobreviven, se multiplican dentro de estas vacuolas y eventualmente lisan sus células hospedadoras diseminándose a otras partes del cuerpo. También despolarizan las barreras epiteliales, afectando la integridad de la estrecha unión entre las células, lo cual tiene como resultado la promoción de un daño citotóxico significativo de las células epiteliales.

La inducción de la síntesis *de novo* de proteínas es necesaria para la invasión y está regulada por el microambiente de la fase de crecimiento de las células epiteliales superficiales(bajo contenido de oxígeno). Solo los

microorganismos viables y metabólicamente activos pueden adherirse a la superficie de las células huéspedes. La adherencia es seguida casi inmediatamente por la internalización dentro de las células huéspedes³⁷.

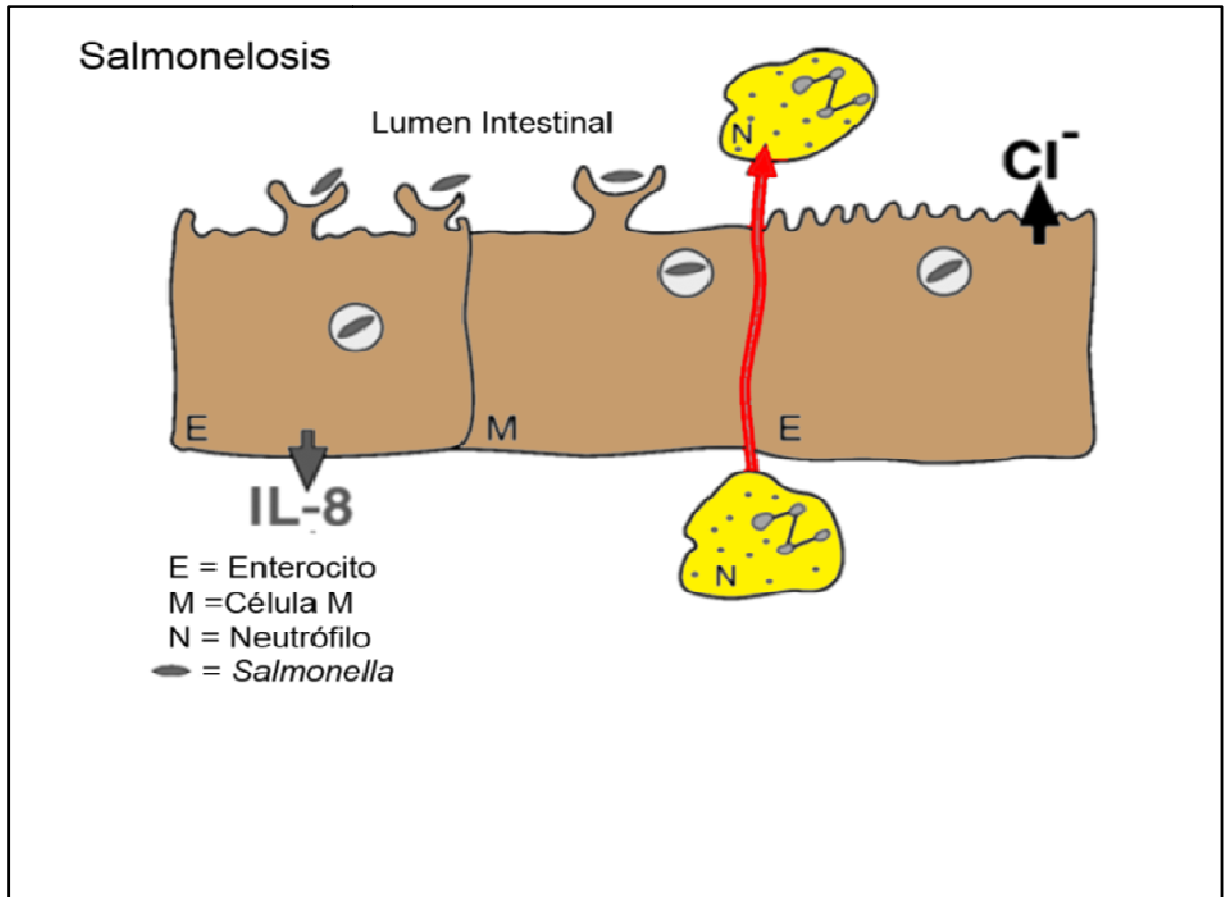


Figura 1. Interacción de las serovariedades invasivas de *Salmonella* con la cripta de la microvellosidad de las células epiteliales

Fiebre tifoidea

S. enterica serovar Typhi causa una infección sistémica, la fiebre tifoidea. En el intestino delgado se adhiere a las células de la mucosa y luego las invade. Las células M, que son células epiteliales especializadas, que recubren las placas de Peyer, son probablemente el sitio de la internalización

de la bacteria y de su transporte hacia el tejido linfoide. Después de la penetración, los microorganismos invaden los folículos linfoides y luego el drenaje mesentérico; algunos pasan a las células reticuloendoteliales del hígado y del bazo. *S. enterica* serovar Typhi es capaz de sobrevivir y multiplicarse dentro de las células mononucleares fagocíticas de los folículos linfoides, el hígado y el bazo (Figura 2)⁴².

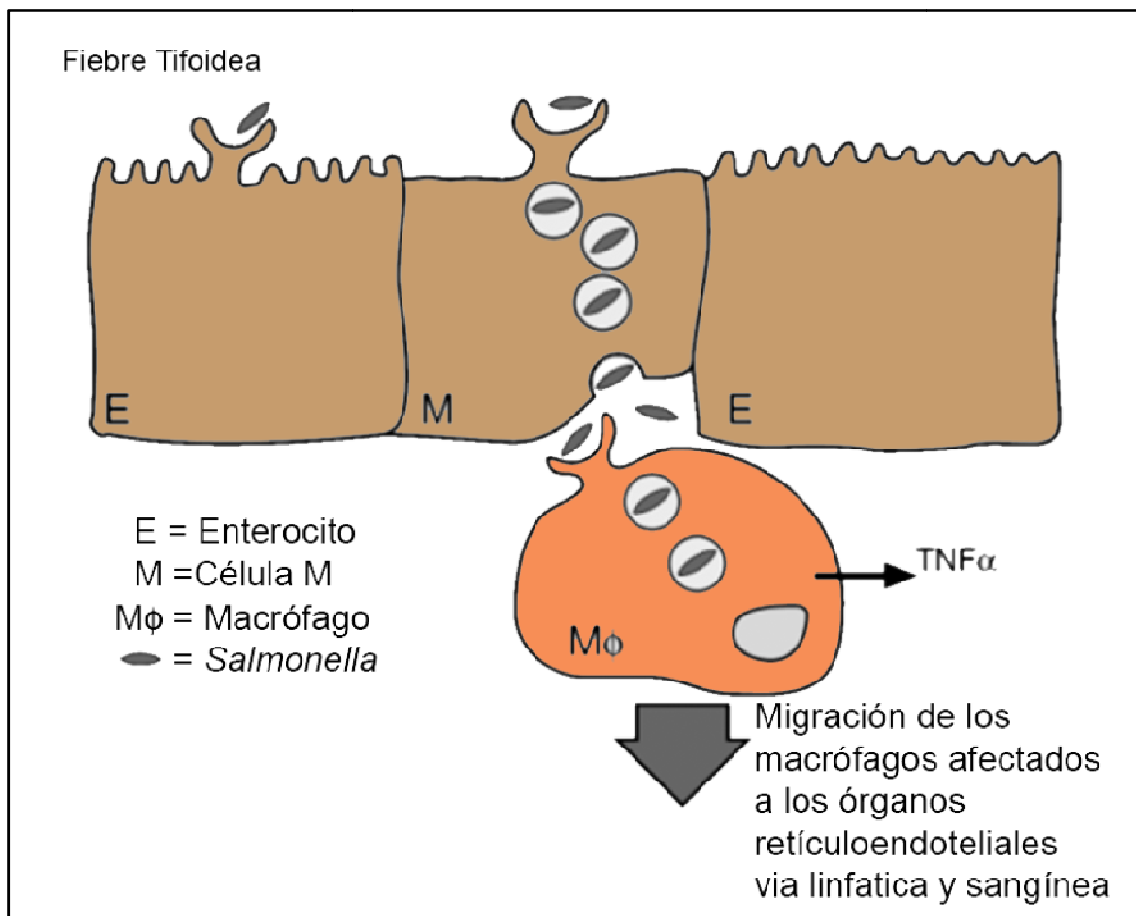


Figura 2. Patogenia de la fiebre tifoidea

Factores bacterianos de virulencia

Varios genes han sido identificados como esenciales para que *Salmonella* entre en las células epiteliales. Se han identificado genes que

codifican fimbrias y proteínas involucrados en la patogénesis de *S. enterica* serovar Enteritidis y *S. enterica* serovar Typhimurium. Entre otros, se pueden mencionar los genes *sef* (fimbrias de *S. enterica* serovar Enteritidis) y *pef* (fimbrias codificadas por plásmidos)⁶¹. Los productos proteicos de muchos de estos genes son similares a las proteínas presentes en los plásmidos de virulencia de *Shigella* spp. y de *Yersinia* spp.

Los genes que codifican los factores de virulencia y regulan su síntesis y secreción se encuentran en lo que se denominan islas de patogenicidad. Éstas son segmentos de ADN insertos dentro del cromosoma. La mayoría de ellas están ubicadas adyacentes a genes de ARN de transferencia y tienen una composición de G + C diferente del resto del cromosoma. Estas islas de patogenicidad codifican sistemas especializados de secreción denominados sistemas tipo III. Éstos son sistemas de transporte de proteínas que exportan factores de virulencia hacia las células huésped, alterando la función normal de dicha célula en beneficio de la bacteria invasora y se activan cuando el patógeno entra en contacto con la célula⁶².

Las proteínas reguladoras que controlan la síntesis de múltiples proteínas a nivel del gen de transcripción, son también esenciales para la patogénesis de *Salmonella*; ejemplos de ellos son: *phoP/phoQ*, que regulan la síntesis de fosfatasa ácida, proteína necesaria para la supervivencia del microorganismo dentro de los macrófagos⁷. La resistencia a proteínas catiónicas antimicrobianas en los mamíferos y al pH ácido, además de otros factores, son necesarios para la invasión a las células epiteliales.

Algunas serovariedades poseen plásmidos de elevado peso molecular, que pueden ser considerados como plásmidos específicos de

serovariedad(SSPs). Las serovariedades que contienen dichos plásmidos son: *S. enterica* serovar Enteritidis, *S. enterica* serovar Typhimurium, *S. enterica* serovar Dublin, *S. enterica* serovar Choleraesuis, *S. enterica* serovar Pullorum y *S. enterica* serovar Gallinarum. Estos plásmidos no se han identificado en otras serovariedades tales como *S. enterica* serovar Virchow y *S. enterica* serovar Hadar, ni en *S. enterica* serovar Typhi. Son plásmidos generalmente no conjugativos y no portan marcadores fenotípicos fácilmente identificables, como los de resistencia a los antimicrobianos.

Características culturales

Para el diagnóstico de *Salmonella* spp. se pueden usar muestras de: materia fecal, sangre, orina, bilis, material de abscesos y líquido cefalorraquídeo.

Materia fecal

La muestra se debe obtener en el período agudo de la enfermedad, antes de iniciar el tratamiento con antimicrobianos. Con un hisopo estéril, se recoge una pequeña cantidad de una evacuación espontánea reciente, seleccionando las partes mucosas o sanguinolentas. En caso de no poder obtener esta muestra, se hace un hisopado rectal (menor recuperación). Las muestras que no se pueden procesar dentro de las dos horas, se deben colocar en medio de transporte. Como medio de transporte se usa Cary-Blair, que tiene la ventaja de ser estable hasta 18 meses después de su preparación, cuando las

condiciones de almacenamiento son correctas. En este medio se puede conservar la muestra hasta 5 días, siempre refrigerada, en heladera a 4°C.

Sangre

Se deben recolectar no menos de dos muestras. Las extracciones se deben realizar antes de iniciar el tratamiento con antimicrobianos. El volumen a inocular, siempre debe mantener una relación 1/10 con respecto al volumen del caldo del frasco a utilizar. En caso de utilizar medios comerciales, se deben seguir las indicaciones del fabricante. El hemocultivo es el método diagnóstico estándar en el caso de fiebre tifoidea y puede resultar positivo en el 60 – 80 % de los casos, en ausencia de tratamiento antibiótico⁴².

Material de abscesos, orina, bilis

Se deben recoger en recipientes estériles, antes de comenzar con el tratamiento antimicrobiano. Si no se pueden procesar inmediatamente estos materiales después de ser obtenidos, se deben conservar refrigerados, en heladera a 4 °C.

Líquido cefalorraquídeo (LCR)

Se debe recoger en tubos secos estériles, antes de comenzar con el tratamiento antimicrobiano. Si no se puede procesar este material inmediatamente después de ser obtenido, se debe conservar a temperatura ambiente.

Medios de enriquecimiento

Para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* spp. en materia fecal, se recomienda el uso de caldo selenito o caldo tetratiónato.

Estos caldos, son muy selectivos e inhiben algunas serovariedades de *Salmonella*.

Medios de cultivo

Para el aislamiento de *Salmonella* spp., a partir de distintas muestras biológicas, se utilizan, medios de baja selectividad como el agar MacConkey (MC) o el agar eosina azul de metileno (EMB), de selectividad intermedia como el agar *Salmonella*-*Shigella* (SS), el agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD) o el agar Hektoen (HE) y medios de alta selectividad como el agar verde brillante (BG) o el agar sulfito de bismuto (BS). Este último se usa para el aislamiento de *S. enterica* serovar Typhi.

Características de las colonias

Las características de las colonias de *Salmonella* spp., en los medios de cultivo, de baja, intermedia y alta selectividad, se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Características de las colonias en los distintos medios de baja, intermedia y alta selectividad

Medio de cultivo	Selectividad	Aspecto de las colonias
Agar MC	Baja	Incoloras

Agar EMB	Baja	Incoloras
Agar SS	Intermedia	Incoloras con centro negro
Agar XLD	Intermedia	Rojas con centro negro
Agar HE	Intermedia	Verdes-azuladas con centro negro
Agar BG	Alta	Rosadas pálidas
Agar BS	Alta	Negras con brillo metálico

Identificación a nivel de género, especies, subespecies y serovariedades

Morfología microscópica

Los miembros del género *Salmonella* son bacilos gram negativos, de 2-3 µm de largo x 0,4-0,6 µm de ancho.

Pruebas bioquímicas

Las placas de los medios de cultivo (agar MC, agar EMB, agar SS, agar XLD, agar HE, agar BG y agar BS) se incuban a 37 °C, durante 18 - 24 h. Las colonias características convexas de 2 a 4 mm de diámetro, se siembran en estrías en agar tripteína de soja (TSA), en agar hierro tres azúcares (TSI) y en agar lisina hierro (LIA) y se incuban a 37°C, durante 18 - 24 h. La mayoría de las cepas de *Salmonella* spp. dan las siguientes reacciones: TSI alcalino/ácido con o sin gas, con producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S), la mayoría no fermenta la lactosa y sí fermenta la glucosa con producción de gas y descarboxila la lisina. *Salmonella enterica* serovar Typhi no produce gas y genera sólo una pequeña cantidad de H₂S.

La mayoría de las serovariedades (99,5%) de *Salmonella* aisladas del hombre y de los animales de sangre caliente pertenecen a *S. enterica* subsp. *enterica* (I) y tienen pruebas bioquímicas características (Tabla 3). Son excepciones *S. enterica* serovar Typhi y *S. enterica* serovar Paratyphi A.

Tabla 3. Pruebas bioquímicas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (I)

Pruebas bioquímicas	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)
Lactosa ^a	-
ONPG	-
Producción de H ₂ S	+
Glucosa (fermentación) ^a	+/-con gas
Dulcitol (fermentación) ^a	+
Adonitol (fermentación) ^a	-
Lisina descarboxilasa ^b	+
Ornitina descarboxilasa ^b	+
Arginina dihidrolasa ^b	+
Urea (hidrólisis) ^b	-
Indol	-
Rojo de Metilo ^c	+
Voges Proskauer ^c	-
Citrato de Simmons ^b	+
Malonato (utilización) ^c	-

^a Lectura hasta los 7 días, ^b Lectura hasta los 4 días, ^c Lectura a los 2 días

S. enterica serovar Typhi y *S. enterica* serovar Paratyphi A, se pueden diferenciar de otras serovariedades pertenecientes *S. enterica* subsp. *enterica* (I), por las pruebas bioquímicas de la Tabla 4.

Tabla 4. Pruebas bioquímicas diferenciales entre *Salmonella enterica* serovar Typhi, *S. enterica* serovar Paratyphi A y *S. enterica* subsp. *enterica* (I)

Pruebas bioquímicas	S. Typhi	S. Paratyphi A	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)
H ₂ S (TSI)	Trazas	- ^a	+ ^b
Lisina descarboxilasa	+	-	+
Ornitina descarboxilasa	-	+	+
Arginina dihidrolasa	-	-	+
Glucosa (gas)	-	+	+
Citrato de Simmons	-	-	+

^a 90% o más de los resultados negativos, ^b 90% o más de los resultados positivos

Problemas del diagnóstico diferencial

A) Algunas cepas de *S. enterica* subsp. *enterica* (I) se pueden confundir con otras enterobacterias productoras de H₂S como *Proteus mirabilis* y *Citrobacter freundii* que son comensales del aparato digestivo del hombre y de los animales de sangre caliente, pero que no son enteropatógenas (Tabla 5).

Tabla 5. Caracteres bioquímicos diferenciales entre *Salmonella* subsp. *enterica* (I), *Citrobacter freundii* y *Proteus mirabilis*

Pruebas bioquímicas	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	<i>C. freundii</i>	<i>P. mirabilis</i>
H ₂ S (TSI)	+ ^a	+	+
Urea (hidrólisis)	- ^b	d ^c	+
Fenilalanina desaminasa	-	-	+
Lisina descarboxilasa	+	-	-
Ornitina descarboxilasa	+	d	+
Lactosa (fermentación)	-	d	-
Dulcitol (fermentación)	+	d	-
ONPG	-	+	-
Glicerol (fermentación)	-	+	d

^a 90% o más de los resultados positivos, ^b 90% o más de los resultados negativos, ^c Diferentes reacciones

B) Las cepas de *C. freundii* suelen ser identificadas por error como *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa) (serovariedades monofásicas) o *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb) (serovariedades difásicas), en razón de compartir caracteres bioquímicos tales como: H₂S (TSI) +, ONPG + y un perfil de fermentación de hidratos de carbono muy parecido (Tabla 6).

C) Muy raramente cepas de *S. enterica* subsp. *enterica* (I) se pueden confundir con otras entrobacterias productoras de H₂S, como *Escherichia coli* H₂S positivo o *Edwardsiella tarda* (Tabla 7).

Tabla 6. Caracteres bioquímicos diferenciales entre *Salmonella* subsp. *enterica* IIIa y IIIb y *Citrobacter freundii*

Pruebas bioquímicas	<i>S. subsp. enterica</i> IIIa y IIIb	<i>C. freundii</i>
Lisina descarboxilasa	+ ^a	- ^b
Ornitina descarboxilasa	+	- ^c
Glicerol (fermentación)	-	+
Malonato (utilización)	+	-
Gelatina (hidrólisis)	+ ^d	-

^a 90% o más de los resultados positivos, ^b90% o más de los resultados negativos, ^c Con excepciones, ^d Lectura hasta 30 días

Tabla 7. Caracteres bioquímicos diferenciales entre *Salmonella* subsp. *enterica* (I), *Edwardsiella tarda* y *Escherichia coli* H₂S +

Pruebas bioquímicas	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	<i>E. tarda</i>	<i>E. coli</i> H ₂ S +
Indol	- ^a	+ ^b	+
Citrato de Simmons	+	-	-
Lisina descarboxilasa	+	+	+
Arginina dihidrolasa	+	-	-/+
Manitol(fermentación)	+	-	+
Dulcitol(fermentación)	+	-	+/-

Ramnosa (fermentación)	+	-	+
Xilosa (fermentación)	+	-	+
ONPG	-	-	+

^a 90% o más de los resultados positivos, ^b 90% o más de los resultados negativos

Serotipificación

La determinación del serogrupo somático (O) es suficiente para la confirmación de un aislamiento como *Salmonella* spp. La serotipificación completa es de suma utilidad para los Laboratorios de Referencia, ya que desde el punto de vista epidemiológico permite establecer la prevalencia de determinadas serovariedades en distintas zonas geográficas. También es de utilidad para el estudio de brotes y para conocer la fuente de infección y las vías de transmisión.

La serotipificación de cepas de *Salmonella* spp. involucra la identificación de antígenos somáticos de superficie [lipopolisacárido (LPS), antígenos O, (Ag O)], antígenos flagelares [proteínas, antígenos H, (Ag H)] y del antígeno capsular capsular [polisacárido, antígeno Vi, (Ag Vi)]. La mayoría de las cepas de *Salmonella* spp. expresan dos fases flagelares pero también se conocen variantes afásicas, monofásicas y trifásicas.

La identificación de las serovariedades surge como consecuencia de la combinación antigénica de factores somáticos (O) y flagelares (H), con el agregado del antígeno capsular (Vi) para unas pocas serovariedades y se presenta en el Esquema de White – Kauffmann - Le Minor²¹.

A) Antígenos somáticos (Ag O)

Están compuestos por complejos de fosfolípidos y polisacáridos; su composición es aproximadamente: 60 % polisacáridos, 20-30 % lípidos y 3,5-4 % hexosamina.

Son cadenas laterales de polisacáridos del LPS de envoltura que se encuentra en todos los microorganismos gram negativos.

La cadena de polisacáridos del antígeno O es un polímero de unidades repetidas de oligosacáridos (de 3 a 5 azúcares) lineales o ramificados. La naturaleza de los grupos terminales y el orden en que se encuentran las unidades repetidas de la cadena, determina la especificidad antigénica somática de la bacteria. Como esta estructura difiere ampliamente entre las distintas serovariedades, hay diferencias en la especificidad antigénica O²⁷.

Estos antígenos son termoestables y resistentes a los ácidos diluidos y al alcohol.

La estructura somática se denomina con la letra O seguida de números arábigos separados por comas, por ej.: *S. enterica* serovar Typhimurium O:1,4,[5],12; *S. enterica* serovar Enteritidis O:1,9,12.

Los Ag O se pueden clasificar de la siguiente manera:

1) Factores mayores, que identifican el grupo antigénico O; por ej.: el factor O:4, el factor O:9.

2) Factores menores, que pueden ser:

a) Los que tienen poco o ningún valor discriminativo porque siempre están asociados a otro factor; por ej.: O:12 que siempre está asociado con O:2, O:4 y O:9, como se presenta en *S. enterica* serovar Paratyphi A O: 1,2,12, en *S. enterica* serovar Typhimurium O: 1,4,[5],12 y en *S. enterica* serovar Enteritidis O: 1,9,12.

b) Los que surgen como consecuencia de una modificación química de los antígenos mayores; por ej.: O:5 resulta de la acetilación de la abecuesa presente en las unidades repetidas del polisacárido responsable de la

especificidad O:4,12; O:1 resulta de la inserción de un residuo de glucosa en la galactosa de la cadena de polisacárido, como es el caso de *S. enterica* serovar Typhimurium O:1,4,[5],12.

B) Antígenos Flagelares (Ag H)

El flagelo es una estructura compleja que consiste en un cuerpo basal, un segmento de unión (*hook*) y un filamento. El cuerpo basal ancla el flagelo a la envoltura de la célula y el *hook* une el cuerpo basal con el filamento. En la serotipificación flagelar de *Salmonella* se usa solamente la especificidad antigénica del filamento.

El filamento está constituido por flagelina, que es una proteína de alto peso molecular. En *Salmonella* se han encontrado más de 60 especificidades antigénicas flagelares. Las diferencias antigénicas surgen debido a variaciones en la estructura primaria (contenido en aminoácidos y orden de ubicación) de las distintas moléculas de flagelina²⁷.

Estos antígenos son sensibles al calor.

Unas pocas serovariedades de *Salmonella* poseen un solo antígeno flagelar, esas cepas se llaman monofásicas, por ej.: *S. enterica* serovar Enteritidis (1,9,12:g,m:-), *S. enterica* serovar Typhi (1,9,12:[Vi]:d:-); pero la gran mayoría de las serovariedades tienen dos antígenos flagelares o sea son cepas difásicas; por ej.: *S. enterica* serovar Typhimurium (1,4,[5],12:i:1,2) y *S. enterica* serovar Newport (6,8,20:e,h:1,2), que expresan la fase 1 (constituida en los ejemplos por los Ag: H:i y H:e,h, respectivamente) y la fase 2 (por el Ag: H:1,2).

C) Antígeno Capsular (Ag Vi)

Entre los antígenos capsulares de las enterobacterias, el Vi es el más importante en el género *Salmonella*. Es el único verdadero polisacárido capsular; es un homopolímero no ramificado del ácido α -1,4-2-desoxi-2-N-galacturónico. Se encuentra en sólo tres serovariedades: *S. enterica* serovar Typhi, *S. enterica* serovar Paratyphi C y en algunas cepas de *S. enterica* serovar Dublin²⁷.

Este antígeno es sensible al calor y enmascara al antígeno O.

Descripción del Esquema de White - Kauffmann - Le Minor

Sobre la base de los componentes antigénicos somáticos (O), flagelares (H) y capsular (Vi), se ha establecido lo que se denomina el Esquema de White - Kauffmann - Le Minor, que agrupa a todas las serovariedades conocidas. Este esquema es elaborado y actualizado por el Centro Colaborador de la OMS de Referencia e Investigación de *Salmonella*, del Instituto Pasteur, de París, Francia²¹.

El esquema está conformado por cuatro columnas:

- Primera columna: Indica el nombre de la serovariedad, si la misma pertenece a *S. enterica* subsp. *enterica* (I) o las siglas S. II, S. IIIa, S. IIIb, S. IV, S. V, S. VI; indicando que la serovariedad considerada pertenece a la subespecie II o IIIa, etc.

- Segunda columna: Antígenos somáticos (O). Los números indican el o los factores del AgO y se escriben separados por una coma. Las serovariedades se clasifican en grupos somáticos, cada uno de ellos caracterizado por un factor O mayor. Así se determinan los grupos A, B, C, etc. Por ej.: el grupo O:2 (A) está integrado por *S. enterica* serovar Paratyphi A (1,2,12:a:-) entre otras, el grupo O:4 (B) por *S. enterica* serovar Typhimurium (1,4,[5],12:i:1,2), *S. enterica* serovar Agona (1,4,[5],12:f,g,s:-), *S. enterica* serovar Saintpaul (1,4,[5],12:e,h:1,2), etc.

El Esquema de White - Kauffmann - Le Minor, presenta 67 grupos O, desde el grupo A hasta el Z y luego continúa con números, desde el O:51 hasta el O:67.

- Tercera y cuarta columna: Antígenos flagelares (H). Se indican los factores de las fases 1 y 2, del Ag H, respectivamente. Para la fase 1 los factores se denominan con letras minúsculas, seguidas algunas veces por un número que figura como subíndice y para la fase 2 se emplean en general números arábigos, aunque también se utilizan letras minúsculas. Un signo "negativo" indica que la fase considerada está ausente y por lo tanto la serovariedad es monofásica.

- Los símbolos para los factores somáticos determinados por conversión fágica están subrayados (por ej.: 1,2,12)
- [] = Los factores O o H entre corchetes, no subrayados, pueden estar presentes o ausentes sin relación con la conversión fágica. Por ej.: el factor [5] del grupo O:4(B). Cuando los factores H están entre corchetes significa que ellos se encuentran excepcionalmente en cepas salvajes.

Ejemplos:

S. enterica serovar Enteritidis 1, 9,12:g,m:-

El Ag O es 1,9,12; el Ag H (fase 1) es g,m; el Ag H (fase 2) es -; la fase 2 está ausente, por lo tanto la serovariedad es monofásica.

S. enterica serovar Typhimurium 1,4,[5],12:i:1,2

El Ag O es 1,4,[5],12 ; el Ag H (fase 1) es H:i ; el Ag H (fase 2) es H:1,2; las dos fases flagelares están presentes, por lo tanto la serovariedad es difásica.

La serotipificación, para la determinación de la estructura somática (O), flagelar (H) y del antígeno capsular (Vi), se debe realizar de acuerdo a las especificaciones dadas por el productor de los antisueños diagnósticos que se empleen.

Serotipificación somática

La determinación del Ag O de *Salmonella* spp., se realiza por aglutinación en lámina, a partir de un cultivo en agar TSA, incubado a 37 °C, durante 18 a 24 h.

Siempre se debe verificar que el cultivo se encuentre en forma lisa, o sea que no aglutine con solución fisiológica. Una porción del cultivo se mezcla con solución fisiológica, con un ansa o un palillo y se rota suavemente la lámina durante 1 min. Luego se observa la presencia o ausencia grumos.

- Si hay grumos la cepa está rugosa y no se puede realizar la serotipificación somática (O). Para revertir la rugosidad, se realizan subcultivos en agar sangre o Mueller Hinton, de manera de recuperar la forma lisa y poder

continuar con la serotipificación somática. Si no es posible la reversión de la forma rugosa a lisa, se debe confirmar la identificación por pruebas bioquímicas y realizar la serotipificación flagelar (H).

- Si no presenta grumos se realiza la serotipificación somática (O) como se indica a continuación.

En una lámina de vidrio se enfrenta una suspensión del cultivo en solución fisiológica con antisueros somáticos polivalentes que detectan múltiples factores antigénicos correspondientes a los grupos O más frecuentes: O:2 (A), O:4 (B), O:7 (C1), O:8 (C2-C3), O:9 (D1) y O:3,10 (E1). Estos antisueros se presentan en distintas combinaciones comerciales, porque aproximadamente el 95% de las serovariedades aisladas del hombre y de los animales pertenecen a alguno de estos grupos. Estos antisueros polivalentes cumplen la función de una primera selección en grandes grupos.

Si hay aglutinación con alguno de los antisueros polivalentes, se prueban los antisueros de grupo O correspondientes y a continuación los antisueros que detectan factores que están asociados al respectivo grupo O.

Las reacciones de aglutinación se deben leer, dentro del minuto. Aquellas reacciones débiles o que ocurren después de un minuto deben ser consideradas inespecíficas.

Consideraciones a tener en cuenta

Si el cultivo en estudio no reacciona con ninguno de los antisueros polivalentes probados y bioquímicamente pertenece al género *Salmonella*, puede tratarse de:

a) Una serovariedad no comprendida en dichos antisueros, en tal caso se debe remitir la cepa al Laboratorio de Referencia.

b) Una serovariedad que presente antígeno de envoltura Vi (*S. enterica* serovar Typhi, *S. enterica* serovar Paratyphi C y algunas cepas de *S. enterica* serovar Dublin). En este caso se enfrenta el cultivo con el antisuero Vi.

Determinación del Antígeno Vi

Cuando se sospecha la presencia del del Ag Vide *Salmonella* spp., se realiza su determinación por aglutinación en lámina, a partir de una suspensión en solución fisiológica de un cultivo en agar TSA, incubado a 37°C, durante 18 a 24 h, mismo, en las tres serovariedades anteriormente mencionadas.

El Ag Vi puede enmascarar al Ag O impidiendo la aglutinación con los antisueros somáticos. Por esta razón, si la aglutinación con el antisuero Vi es positiva, se calienta una suspensión bacteriana en solución fisiológica, en agua hirviendo, durante 30 a 60 min, para remover la cápsula. Luego se enfría y se prueba nuevamente con los antisueros O polivalentes de grupo y factores respectivos.

Después del calentamiento el aislamiento no aglutina con el antisuero Vi, pero si lo hace con los antisueros O correspondientes.

Serotipificación flagelar

La determinación del Ag H de *Salmonella* spp. se realiza por aglutinación en tubo o en lámina, dependiendo de las características de los antisueros empleados y de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

A) Procedimiento en tubo

La serotipificación flagelar en tubo, se realiza a partir de un cultivo móvil de *Salmonella* spp. sembrado en caldo tripteína de soja (TSB) o caldo nutritivo, incubado a 37 °C durante 18 a 24 h. Con el mismo se prepara la suspensión de trabajo, agregando igual volumen de solución fisiológica formolada al 1%. A continuación, se deja reposar durante 1 h a temperatura ambiente.

Se mezcla un volumen de antisuero y otro de la suspensión de trabajo en tubos de ensayo o de Khan, de acuerdo a lo recomendado por el fabricante. Se incuba en baño maría a 50°C durante una hora y se observa la floculación.

La suspensión de trabajo, primero se prueba con antisueros polivalentes H, que reconocen múltiples factores antigénicos flagelares. Si hay aglutinación, con uno o dos de los antisueros H polivalentes, se enfrenta, con los antisueros de fase H correspondientes. Si el antisuero de fase flagelar está compuesto por más de un factor, por ej.: *S. enterica* serovar Newport (6,8,20:e,h:1,2). Ag H (fase 1): e,h y Ag H (fase 2): 1,2, se deben determinar los factores H correspondientes, utilizando antisueros específicos de factor: H:h o H:2, en este caso.

A) Procedimiento en lámina

La serotipificación flagelar en lámina, se realiza a partir de un cultivo móvil de *Salmonella* spp., sembrado en un agar blando, incubado a 37°C, durante 18 a 24 h.

En una lámina de vidrio se enfrenta una suspensión del cultivo en solución fisiológica, con antisueros H polivalentes, posteriormente con los antisueros de fase y con los factores específicos H, según el esquema descrito para la aglutinación en tubo, mezclando cada vez con un ansa o un palillo y rotando suavemente la lámina durante un minuto.

Las reacciones de aglutinación se deben leer dentro del minuto. Aquellas reacciones débiles o que ocurren después del minuto deben ser consideradas inespecíficas.

- Consideraciones a tener en cuenta
 - Si la cepa de *Salmonella* spp., de la cual se ha identificado el Ag O, no reacciona con ninguno de los antisueros flagelares polivalentes, puede deberse a:
 - a) La cepa puede presentar un antígeno no incluido en los antisueros polivalentes. En este caso debe ser remitida al Laboratorio de Referencia, para completar su serotipificación.
 - b) Se puede tratar de una cepa inmóvil, por la ausencia de flagelos.
 - c) Se puede tratar de una cepa con movilidad reducida. En este caso se debe exaltar la movilidad por pasajes sucesivos en tubos con medio de Craigie o en placas de Petri, que contengan agar blando (Figura 3).
 - Si el cultivo aglutina con un solo antisuero polivalente flagelar, se puede deber a:
 - a) Que se trate de una serovariedad monofásica.
 - b) Que sea una serovariedad difásica, de acuerdo al esquema de White - Kauffmann-Le Minor, por los resultados de la aglutinación O y únicamente se exprese una sola fase flagelar: En este caso se debe

poner en evidencia la fase no detectada usando el “Método de inversión de fase”.

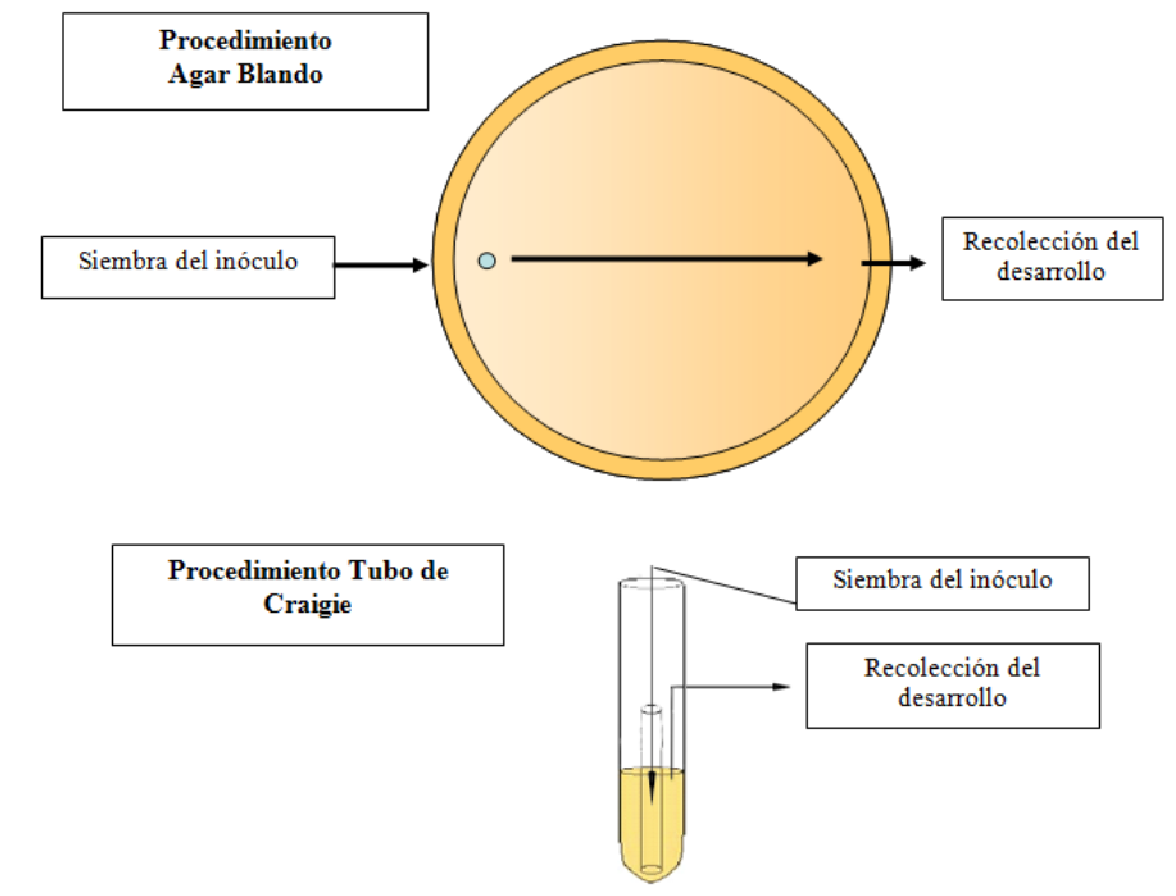


Figura 3. Métodos para exaltar la movilidad

Método de Inversión de Fase

La mayoría de las serovariedades de *Salmonella* son difásicas. En estas cepas los antígenos flagelares, están regulados coordinadamente, de tal

manera que una única célula bacteriana expresa sólo un antígeno flagelar. Sin embargo la población bacteriana, o sea un cultivo, es una mezcla de células que expresan ambas fases. Por ej.: un cultivo de *S. enterica* serovar Typhimurium (1,4,[5],12:i:1,2), contiene células que expresan la fase 1, H:i y células que expresan la fase 2, H:1,2. Si la población está balanceada, el cultivo aglutina con los antisueros contra las fases H:i y H:1,2. Comúnmente, no hay una distribución uniforme y la proporción de células que expresa una de las fases es mucho más grande; por lo tanto, cuando se realiza la serotipificación, sólo una de las fases es inicialmente detectada. Para poder determinar la otra fase, es necesario aumentar la población de células que expresen la fase antigénica no detectada. Por ej.: si el antígeno H:i fue el que se detectó, la segunda fase antigénica se determina haciendo crecer el cultivo en un agar blando, que contenga el antisuero de la fase H:i. Este inmovilizará a las células que expresan el antígeno H:i y permitirá que las que expresan la otra fase flagelar, H:1,2, se muevan y sean detectadas.

La inversión de fase se puede realizar de dos maneras: en tubo de Craigie o en una placa de Petri que contenga agar blando (Figura 3). En ambos casos, se funde el medio, se deja enfriar a 50°C y se agrega el antisuero para la inversión de fase, correspondiente a la fase flagelar previamente determinada. Se homogeneiza el medio y se deja solidificar. A continuación se siembra el cultivo de la fase detectada previamente y se incuba a 37°C, durante 18 a 24 h. En el tubo de Criagie se recoge el crecimiento de la superficie exterior del mismo y en la placa de agar blando del extremo opuesto al del punto de siembra y se procede a la serotipificación flagelar en tubo o en lámina.

De este modp se podrá determinar la fase flagelar que se encontraba en minoría y completar la serotipificación de la serovariedad difásica en estudio.

Pruebas serológicas

Reacción de Widal

La reacción de Widal, que mide las aglutininas contra el LPS (Ag O) y el Ag H de *S. enterica* serovar Typhi, en el suero de pacientes con sospecha de padecer fiebre tifoidea, se ha usado desde el siglo XIX. Es una prueba simple y de bajo costo que se puede hacer en lámina (mejor que en tubo) y en unos pocos minutos. Su uso se ha visto obstaculizado, por la falta de estandarización de los reactivos utilizados y por la interpretación inadecuada de los resultados.

La reacción de Widal requiere idealmente dos muestras de suero tomadas, una en la fase aguda de la enfermedad y la otra en la convalecencia, con un intervalo de aproximadamente de 10 días. El resultado positivo se determina, por un incremento de 4 veces en el título de anticuerpos, entre la primera y la segunda muestra. Sin embargo, los títulos de anticuerpos en los pacientes infectados, a menudo se elevan antes de la aparición de los síntomas clínicos. Esto dificulta demostrar el aumento obligatorio de 4 veces en el título de anticuerpos entre la muestra inicial y la posterior para la confirmación del diagnóstico.

Aunque en algunos casos, en la práctica, el resultado de una única muestra de suero es útil para ayudar al manejo del paciente, en otros puede resultar confuso. El resultado de una única muestra de suero generalmente conduce a muchos resultados falsos positivos y falsos negativos.

El conocimiento de los niveles basales de anticuerpos de la población de un área geográfica ayuda a la interpretación de la reacción de Widal y solo se debe utilizar en pacientes donde hay una razonable sospecha de fiebre tifoidea.

Desafortunadamente, se conoce un gran número de reacciones cruzadas, entredeterminantes antigénicos de *S. enterica* serovar Typhi, con otras serovariedades de *Salmonella* y con otras enterobacterias, como así también, con varias enfermedades, no causadas por *Salmonella*, como la malaria, el dengue y la tuberculosis. Esto hace, que el rol de la reacción de Widal, sea polémico por su poca sensibilidad y especificidad.

Se utilizan también pruebas de enzimoimmunoensayo (ELISA) para definir con mayor precisión la respuesta inmune y su aplicabilidad al diagnóstico. Los antígenos generalmente usados en los estudios basados en ELISA, son el LPS, antígenos flagelares, antígeno Vi o antígenos de membrana externa.

Con las técnicas de ELISA las mediciones de anticuerpos anti-LPS y anti-flagelo han sido más sensibles que las determinadas por la reacción de Widal, pero presentan limitaciones similares en cuanto a la especificidad⁴¹.

Métodos moleculares

Subtipificación

La habilidad para determinar la relación existente entre aislamientos de *Salmonella* y la capacidad para establecer la fuente a partir de la cual se inició la infección humana son de gran valor para reducir la incidencia de las enfermedades de transmisión alimentaria y evitar la diseminación de brotes debidos a este patógeno. Para esto, es fundamental combinar las investigaciones epidemiológicas con estudios de subtipificación molecular que permitan establecer la relación genética entre los aislamientos.

La electroforesis en campo pulsado (PFGE) es considerada actualmente una de las técnicas de referencia para la subtipificación molecular de diferentes bacterias y ha sido de particular utilidad para la vigilancia e investigación de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, en el marco de la Red PulseNet Interacional⁵⁸. Su aplicación ha sido limitada por los problemas de reproducibilidad y la dificultad para comparar los patrones de bandas obtenidos en diferentes laboratorios. Este problema de compatibilidad de resultados intra e interlaboratorio puede ser resuelto usando protocolos altamente estandarizados para generar y analizar datos y ese fue el objetivo de PulseNet, desde la creación de la Red por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), de los Estados Unidos, en 1996⁵⁸.

La técnica de PFGE se basa en el análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción generados a partir de la digestión del ADN genómico con enzimas de restricción de corte poco frecuente⁴⁵. Brevemente, el ADN blanco sin cortar se obtiene de embeber el microorganismo intacto en moldes de agarosa y luego se lisa enzimáticamente la pared celular y se digieren las proteínas celulares. Posteriormente, el

genoma aislado es digerido con enzimas de restricción que tienen sitios de reconocimiento poco frecuentes en el ADN en estudio. Después de la digestión, se realiza la electroforesis en un gel de agarosa, aplicando campos de electricidad en direcciones alternadas, de manera de separar los fragmentos de ADN obtenidos, cuyo tamaño varía entre 10 y 800 Kb. El gel se tiñe a continuación con bromuro de etidio, se visualiza en un transiluminador con luz UV y se registra fotográficamente para su posterior análisis. El resultado de aplicar PFGE al ADN en cuestión provee un patrón de restricción cromosómico con excelente resolución, generalmente compuesto de 5 a 20 fragmentos diferentes.

Para la subtipificación de aislamientos de *Salmonella* spp. se recomienda el protocolo estandarizado de la Red PulseNet⁵⁰, utilizando como cepa estándar *S. enterica* serovar Braenderup H9812²³. Este protocolo ha sido aplicado para la vigilancia y el estudio de numerosos brotes en nuestro país y en la región de América Latina^{10, 46, 53}.

Sensibilidad a los antibióticos

La diarrea por *Salmonella* spp. es generalmente autolimitada y no requiere tratamiento antimicrobiano. Sin embargo, en caso de fiebre entérica, salmonelosis invasiva y en pacientes con riesgo de infección extraintestinal es crucial el tratamiento antimicrobiano adecuado para la buena evolución del cuadro clínico. Por muchos años el cloranfenicol, la ampicilina y trimetoprima/sulfametoxazol fueron las drogas de elección para el tratamiento de estas infecciones, pero la diseminación de la resistencia a estos

antimicrobianos se ha vuelto un problema en varias partes del mundo³⁹. Frente a esta situación debe recurrirse a otras alternativas como las fluoroquinolonas (ciprofloxacina), las cefalosporinas de espectro extendido (ceftriaxona o cefotaxima) y azitromicina⁴⁰.

A fines de los ochenta, se produjo la diseminación de *Salmonella enterica* serovar Typhi y *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A con resistencia a cloranfenicol, ampicilina y trimetoprima/sulfametoxazol causando brotes principalmente en Asia y en menor frecuencia en Latinoamérica y en el Sahara^{17, 33}. En el 2000, emergieron los primeros aislamientos de *S. enterica* serovar Typhi con sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas (SDFQ) (CIM entre 0,12 y 1 µg/ml) en regiones del centro, sur y sudeste asiático, donde años más tarde se describió la falla de tratamiento con fluoroquinolonas en infecciones extraintestinales y donde se desaconseja su uso en infecciones sistémicas³⁹. Finalmente, en los últimos años, se registraron casos esporádicos de resistencia a ceftriaxona en *Salmonella enterica* serovar Typhi mediada por β-lactamasas de espectro extendido (CTX-M-15 y SHV-12)^{3, 44, 52} y β-lactamasas del tipo Amp-C plasmídicas (ACC-1)¹⁸.

La resistencia a los antimicrobianos en *Salmonella* no-Typhi es un problema global. Datos mundiales de vigilancia de principio de los años noventa, muestran valores de resistencia de 20-30% al menos a un antimicrobiano; mientras que en los comienzos del nuevo siglo, en algunos países se registró un aumento cercano al 70%. Algunas serovariedades de *S. enterica* subsp. *enterica* presentan perfiles de sensibilidad característicos, como *S. enterica* serovar Enteritidis con menor resistencia a los antimicrobianos, mientras que en *S. enterica* serovar Typhimurium ocurre lo

contrario⁵⁷. Un ejemplo de esto es el fagotipo multirresistente de *S. enterica* serovar Typhimurium DT104, donde se observa un patrón de multirresistencia característico (ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas y tetraciclina). Los genes de resistencia se encuentran codificados en el cromosoma en el complejo denominado isla genómica de *Salmonella* [*Salmonella genomic island1*] (SGI1)³⁹. Otras serovariedades que también se asocian a multirresistencia son *S. enterica* serovar Virchow, *S. enterica* serovar Hadar y *S. enterica* serovar Blockley en Europa; *S. enterica* serovar Newport y *S. enterica* serovar Heidelberg en Estados Unidos y *S. enterica* serovar Choleraesuis en Taiwan^{12, 63}.

Mecanismos de resistencia

La resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Salmonella* spp. se debe principalmente a la producción de β -lactamasas que son capaces de degradar la estructura química de los antibióticos β -lactámicos. En *Salmonella* spp. no hay enzimas cromosómicas naturales como en la mayoría de las enterobacterias, sino que los genes que codifican para estas enzimas son transportados en plásmidos conjugativos, transposones o integrones que pueden diseminarse horizontalmente entre microorganismos entéricos⁵⁶. La resistencia a ampicilina se debe a la producción de β -lactamasas de amplio espectro (principalmente de tipo TEM-1 y otras como TEM-2, SHV-1, OXA-1, PSE-1 y PSE-4) que hidrolizan eficientemente aminopenicilinas y carboxipenicilinas. La resistencia a cefalosporinas de tercera generación en

Salmonella spp. generalmente resulta de la producción de β -lactamasas de espectro extendido de clase A (BLEE) (principalmente de la familia TEM, SHV, CTX-M y en menor proporción PER y OXA) o C de Ambler (Amp-C) (principalmente CMY y en menor medida DHA y AAC)³⁹. Las BLEE confieren resistencia a penicilinas, a todas las cefalosporinas y monobactames y son inhibibles por ácido clavulánico, tazobactama y sulbactama^{4, 28, 39}. Las β -lactamasas de tipo Amp-C plasmídicas, confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación y cefoxitina, mientras que la actividad in vitro sobre las cefalosporinas de tercera generación (C3G) y el aztreonam es variable. A diferencia de la mayoría de las BLEE, tienen muy débil actividad sobre cefalosporinas de cuarta generación y son inhibibles por los compuestos derivados del ácido borónico y la oxacilina^{4, 28, 64}. La resistencia a los carbapenemes es aún muy rara en aislamientos de *Salmonella* spp. Si bien las BLEE no generan por sí solas resistencia a los carbapenemes, se ha registrado resistencia a imipenem por combinación de producción de β -lactamasas tipo Amp-C plasmídicas (CMY-4) e impermeabilidad por pérdida de la porina Omp-F⁵ y lo más preocupante es que ya han aparecido aislamientos de *Salmonella* spp. resistentes a carbapenemes debido a la presencia de carbapenemasas (IMP-4 y KPC-2)^{32, 59}.

La resistencia a quinolonas en *Salmonella* spp., al igual que en el resto de las enterobacterias, se debe principalmente a mutaciones puntuales en el gen *gyrA* que codifica para la subunidad A de la girasa. La primera mutación en la región QRDR (*quinolone-resistance-determining region*) del gen *gyrA* sólo alcanza para conferir SDFQ con valores de CIM de ciprofloxacina aumentados respecto de los aislamientos salvajes (0,12 - 1 μ g/ml vs 0,008 - 0,06 μ g/ml,

respectivamente) y resistencia a ácido nalidíxico (CIM 128-512 µg/ml), por lo que este último resulta un excelente predictor de la SDFQ²². Este fenotipo de SDFQ ha emergido en esta última década en *Salmonella* spp. y se ha diseminado globalmente³⁹. La importancia de su detección radica en que está relacionado con la demora en la respuesta al tratamiento, falla clínica y mayor mortalidad en los pacientes que reciben ciprofloxacina en infecciones severas²². Hay pocos informes de *Salmonella* spp. completamente resistentes a fluoroquinolonas. Recientemente han surgido nuevos mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas (PMQR) como qnr y aac(6')Ib-cr que resultan en una modesta elevación de las CIM de ácido nalidíxico (8-32 µg/ml) y en SDFQ²². Se desconoce con exactitud el impacto clínico de los PMQR en el tratamiento de la salmonelosis, lo que sí se ha documentado es que requieren mayores concentraciones de fluoroquinolonas para prevenir la selección *in vivo* de mutantes que resultarían resistentes a altos niveles de fluorquinolonas¹⁴. Debido a esta situación, en 2012, el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) aprobó nuevos puntos de corte específicos para ciprofloxacina y *S. enterica* serovar Typhi, *S. enterica* serovar Paratyphi y *Salmonella* spp. extraintestinales que permiten una mejor detección de estos fenotipos¹³.

La resistencia a tetraciclina y cloranfenicol está asociada a la adquisición y expresión de bombas de eflujo (codificadas por los genes *tet* y *floR* o *cml* respectivamente) que remueven las concentraciones tóxicas de antibiótico del interior de la bacteria. La resistencia a cloranfenicol también puede estar dada por modificación de la droga por la cloranfenicol acetiltransferasa (gen *cat*)¹⁶.

Trimetoprima y las sulfonamidas funcionan, inhibiendo competitivamente diferentes enzimas, involucradas en la ruta metabólica de la síntesis del ácido fólico de las bacterias. La adquisición de dihidropteroato sintetetasas (gen *sull* o *sulll*) o dihidrofolato reductasas (gen *dhfr*) alteradas, con afinidad reducida por estas drogas le permite a la bacteria continuar con la síntesis de ácido fólico generando resistencia¹⁶.

Epidemiología local

Los datos de la Red Nacional de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos - WHONET Argentina del período 1999-2009 muestran una marcada disminución en los porcentajes de resistencia de ampicilina (48% en vs. 15%), cefalosporinas de espectro extendido (26% vs. 8%) y trimetoprima/sulfametoxazol (12% vs. 6%) en *Salmonella* spp entre 1999 y 2009. Los porcentajes de resistencia a cloranfenicol y fosfomicina no superaron el 4,9% y 4,3%, respectivamente. No se observó resistencia a altos niveles de ciprofloxacina, pero la resistencia a ácido nalidíxico con SDFQ alcanzó valores del 11,9 % en 2009²⁹.

En 1990 emergieron las primeras cepas de *Salmonella* spp. con BLEE en la Argentina a través de la adquisición del gen *bla*CTX-M-2 por varias serovareidades de *Salmonella* no-Typhi involucradas en infecciones de origen nosocomial en forma de brotes y en casos aislados. También, en algunos casos se observó la adquisición del gen *bla*PER-2^{6, 38}. Más recientemente, se observó la producción de β -lactamasas del tipo Amp-C plasmídicas, pertenecientes a la familia CMY-2 como causa de resistencia a C3G⁴⁹. Estos hallazgos, sumados al aumento en la SDFQ en los últimos años, son

preocupantes y señalan la importancia de la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en este microorganismo.

Edwardsiella

Aspectos taxonómicos

El género *Edwardsiella*, en base a estudios de hibridación del ADN, está compuesto por 3 especies: *Edwardsiella tarda*, *Edwardsiella hoshinae* y *Edwardsiella ictaluri*¹. La especie tipo es *E. tarda*.

Hábitat

Las cepas de *Edwardsiella* spp. se encuentran principalmente, en el agua fresca, en el medio ambiente marino y en animales de sangre fría. *E. tarda*, es la especie predominante, ya que habita en peces, reptiles, anfibios, pollos, otros animales de sangre caliente y es la única que se aísla del hombre. *E. hoshinae* se aísla de aves y reptiles y *E. ictaluri* de peces, especialmente del bagre (1).

Significado clínico

E. tarda es el único miembro del género *Edwardsiella* que se asocia a enfermedad en los seres humanos. Es un patógeno oportunista. La gastroenteritis es el síndrome infeccioso predominante (constituye el 50 al 80 %

de las infecciones). La diarrea acuosa que cede en forma espontánea, es el cuadro más frecuente, pero también ocurren casos graves²⁴.

Las manifestaciones clínicas de infección extraintestinal por *E. tarda* son raras, pero incluyen, meningitis, colecistitis, endocarditis, osteomielitis, infecciones de tejidos blandos, bacteriemia y septicemia. También es común, la infección de heridas, por inoculación directa. Los factores de riesgo asociados con infecciones por *E. tarda* son: la exposición al medio ambiente acuático o a animales exóticos (anfibios o reptiles), enfermedades hepáticas preexistentes y hábitos alimentarios, como la ingestión de peces y de mariscos crudos^{24, 35}.

Características culturales

Para el diagnóstico de *E. tarda* se pueden usar muestras de materia fecal, sangre, material de abscesos, heridas y líquido cefalorraquídeo.

Para el aislamiento de *E. tarda*, a partir de distintas muestras biológicas, se utilizan medios de cultivo como: agar MC, agar EMB, agar SS, agar XLD y agar HE.

Las colonias de *E. tarda*, en agar MC o agar EMB, son incoloras, porque no fermentan la lactosa. En los otros medios de aislamiento entéricos, son incoloras con el centro negro, por ser microorganismos que producen H₂S.

Identificación a nivel de género y especie

Morfología microscópica

E. tarda son bacilos gram negativos, de 0,8-1,2µm de ancho x 2,0-3,0 µm de largo.

Características culturales

Las placas de medios de cultivo (agar MC, agar EMB, agar SS, agar XLD, agar HE) se incuban a 37 °C, durante 18 - 24 h. Las colonias características, convexas, se siembran en estrías de agar TSA, en agar TSI y en agar LIA y se incuban a 37 °C, durante 18 - 24 h. Las cepas de *E. tarda*, producen las siguientes reacciones: TSI alcalino/ácido con gas, con producción de H₂S, no fermentan la lactosa y sí fermentan la glucosa con producción de gas, y descarboxilan la lisina.

Pruebas bioquímicas

Las características bioquímicas del género *Edwardsiella* se indican en la Tabla 8.

Tabla 8. Caracteres bioquímicos de *Edwardsiella* spp.

Prueba Bioquímica	<i>Edwardsiella</i> spp.
ONPG	- ^a
Movilidad	+ ^{b, c}
Urea (hidrólisis)	-
Indol	+
Lisina descarboxilasa	+
Ornitina descarboxilasa	+ ^c
Arginina dihidrolasa	-
Malonato (utilización)	- ^d
Glucosa (fermentación)	+
Lactosa (fermentación)	-
Dulcitol (fermentación)	-
Inositol (fermentación)	-
Sorbitol (fermentación)	-
Rafinosa (fermentación)	-
Maltosa (fermentación)	+
Xilosa (fermentación)	-
Manosa (fermentación)	+
Citrato de Simmons	-
Rojo de metilo	+ ^(c)
Voges-Proskauer	-
Fenilalanina desaminasa	-

^a 90% o más de los resultados negativos, ^b 90% o más de los resultados positivos, ^c Excepto *E. ictaluri*, ^d Excepto *E. hoshinae*.

Los miembros del género *Edwardsiella* tienen la característica de fermentar muy pocos hidratos de carbono.

Las tres especies del género *Edwardsiella*, se pueden diferenciar mediante las pruebas bioquímicas, indicadas en la Tabla 9.

Tabla 9. Caracteres bioquímicos diferenciales entre *Edwardsiella tarda*, *Edwardsiella hoshinae* y *Edwardsiella ictaluri*

Pruebas bioquímicas	<i>E. tarda</i>	<i>E. tarda</i>	<i>E. hoshinae</i>	<i>E. ictaluri</i>
Biogrupo 1				
SH ₂	+	- ^b	+ L ^c	-
Indol	+	+	+ L ^c	-
Trehalosa (fermentación)	-	-	+	-
Manitol, sacarosa (fermentación)	-	+	[-] ^d	-
Arabinosa (fermentación)	-	+	-	-
Malonato (utilización)	-	-	+	-
Movilidad a 37°C	+	+	+	-
Habitat	Hombre, animales	Reptiles	Aves, reptiles	Bagre

^a 90% o más de los resultados positivos, ^b90% o más de los resultados negativos, ^cPositivo lento, ^d Caracteres negativos la mayoría de las cepas

E. tarda, que produce H₂S, se puede confundir con otras entrobacterias productoras de H₂S, como *S. enterica* subsp. *enterica* (I) y con cepas atípicas de *E. coli* H₂S+ (Tabla 7).

Las cepas genéticamente relacionadas con *E. tarda*, pero que presentan atipias (son H₂S negativas y fermentan la sacarosa, la arabinosa y el manitol) son consideradas como *E. tarda* biogrupo 1.

Sensibilidad a los antibióticos

Las gastroenteritis por *Edwardsiella* spp. son infecciones autolimitadas por lo que generalmente no requieren tratamiento antibiótico. En el caso de infecciones graves o de pacientes de riesgo se han utilizado con éxito ampicilina y trimetoprima/sulfametoxazol, aunque las fluoroquinolonas y las cefalosporinas de espectro extendido también son opciones válidas. En el caso de infecciones extraintestinales pueden utilizarse combinaciones de antibióticos como cefalosporinas y aminoglucósidos²⁴.

Edwardsiella es naturalmente resistente a macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, glucopéptidos, rifampicina y ácido fusídico y, al igual que el resto de las *Enterobacteriaceae*, esto se debe principalmente a la limitada permeabilidad de la membrana externa. También presenta resistencia intrínseca a bencilpenicilinas, oxacilina y colistina. Este género es sensible a la mayoría de los antibióticos activos frente a enterobacterias, como las tetraciclinas, los aminoglucósidos, la mayoría de los antibióticos β -lactámicos, las quinolonas, trimetoprima/sulfametoxazol, cloranfenicol, nitrofurantoína y fosfomicina.

Otra particularidades que posee una β -lactamasa cromosómica, que naturalmente se expresa en tan baja cantidad, que no confiere resistencia a los antibióticos β -lactámicos⁵⁵.

La resistencia adquirida en este género es poco frecuente; se mantiene sensible a la mayoría de los antimicrobianos, pero se ha registrado resistencia a ampicilina, tetraciclinas, trimetoprima/sulfametoxazol y ciprofloxacina^{19, 25, 55}.

Citrobacter

Aspectos taxonómicos

El género *Citrobacter*, en base a estudios de hibridación del ADN, está compuesto por 11 especies: *Citrobacterfreundii*, *Citrobacterkoseri*, *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacterbraakii*, *Citrobacterfarmeri*, *Citrobactersedlakii*, *Citrobacterwerkmanii*, *Citrobacteryoungae*, *Citrobacter rodentium*, *Citrobactergillenni* y *Citrobactermurlinae*⁹. La especie tipo es *C. freundii*.

Hábitat

Los microorganismos del género *Citrobacter* se encuentran comúnmente en el agua, el suelo, los alimentos y en el tracto intestinal de los animales, incluyendo al hombre. Entre las especies de *Citrobacter*, que se aíslan más frecuentemente de especímenes clínicos humanos se encuentran: *C. freundii*, *C. koseri*, *C. amalonaticus*, *C. werkmanii*, *C. braakii* y *C. youngae*. Son patógenos oportunistas³⁰.

Significado clínico

El género *Citrobacter* causa del 1 al 2 % de las infecciones hospitalarias. Los hospederos afectados suelen ser inmunodeprimidos, tener enfermedades

concomitantes o estar hospitalizados. La mayoría de los casos de infección están asociados con *C. freundii*, *C. koseri* y *C. amalonaticus*.

Citrobacter spp. es el agente etiológico de varias infecciones extraintestinales, similares a las descritas para otros bacilos gram negativos, tales como infecciones de las vías urinarias, del tracto respiratorio, intra-abdominales, óseas, de la vía biliar (en particular con cálculos u obstrucción), de heridas quirúrgicas y del sistema nervioso central. También es causa de bacteriemia y de septicemia⁵⁴.

C. freundii se aísla frecuentemente de orina y de heridas quirúrgicas. *C. amalonaticus* causa infecciones urinarias y meningitis neonatales³⁰. *C. koseri* es responsable de brotes de meningitis neonatales, que comúnmente van acompañados por el desarrollo de abscesos cerebrales, con una alta tasa de morbilidad y de septicemias que se originan a partir de infecciones del tracto genitourinario³¹.

Características culturales

Para el diagnóstico de *Citrobacter* spp. se pueden usar muestras de: orina, sangre, bilis, material de abscesos, de heridas y de líquido cefalorraquídeo.

Para el aislamiento de *Citrobacter* spp., a partir de distintas muestras biológicas, se utilizan medios de cultivo como: agar MC, CLDE o agar EMB.

Características de las colonias

Las colonias de *C. freundii*, que en un 78% fermentan la lactosa, generalmente en agar MC son de color rojo y en agar EMB son oscuras. *C. koseri* en un 85 % no fermenta la lactosa y *C. amalonaticus* no lo hace en un 65 %, dando por lo general colonias incoloras tanto en MC como en EMB.

Identificación a nivel de género y especie

Morfología microscópica

Los miembros del género *Citrobacter* son bacilos gram negativos, de 0,3-1,0µm de ancho x 0,6-6 µm de largo.

Características culturales

Las placas de medios de cultivo (agar MC y agar EMB) se incuban a 37°C, durante 18 - 24 h. Las colonias características convexas, se siembran en estrías en agar TSA, en agar TSI y en agar LIA y se incuban a 37°C, durante 18 - 24 h. Las cepas de *C. freundii*, producen las siguientes reacciones en el TSI: ácido/ácido con gas (fermentan la lactosa y la glucosa con producción de gas) y con producción de H₂S. También pueden dar un TSI alcalino/ácido con gas (no fermentan la lactosa y sí la glucosa, con producción de gas) y con

producción de H₂S. En el medio LIA dan alcalino/ácido(no descarboxilan la lisina) con producción de H₂S.

Las cepas de *C. koseri* y *C. amalonaticus*, producen las siguientes reacciones: en el TSI alcalino/ácido con gas (no fermentan la lactosa y sí la glucosa, con producción de gas), sin producción de H₂S. En el medio LIA dan alcalino/ácido sin H₂S (no descarboxilan la lisina).

Pruebas bioquímicas

Las características bioquímicas del género *Citrobacter* se indican en la Tabla 10. Las tres especies de *Citrobacter* de importancia clínica se pueden diferenciar mediante pruebas bioquímicas (Tabla 11).

En la identificación de *C. freundii* se pueden presentar algunas atipias:

- Cepas ONPG negativas: por lo tanto hay que efectuar el diagnóstico diferencial con *S. enterica* subsp. *enterica* (I) (Tabla 5)
- Cepas H₂S negativas o citrato de Simmons negativas.

Otro problema del diagnóstico diferencial, es que cepas típicas de *C. freundii* sean identificadas por error como *S. enterica* subsp. *enterica* (I) (Tabla 5) o como *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa) (serovariedades monofásicas) o *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb) (serovariedades difásicas), en razón de compartir caracteres bioquímicos tales como SH₂y ONPG positivos y un perfil de hidratos de carbono muy parecido (Tabla 6).

Los miembros del género *Citrobacter* se pueden diferenciar mediante las pruebas bioquímicas de la Tabla 12.

Tabla 10. Caracteres bioquímicos de *Citrobacter* spp.

Pruebas bioquímicas	<i>Citrobacter</i> spp.
Movilidad	+ ^a
Urea (hidrólisis)	d ^b
Lactosa (fermentación)	d
Manitol (fermentación)	+
Lisina descarboxilasa	- ^c
Ornitina descarboxilasa	d
Arginina dihidrolasa	d
ONPG	+
Citrato de Simmons	+
Rojo de metilo	+
Voges-Proskauer	-

^a 90% o más de los resultados positivos, ^b Diferentes reacciones, ^c 90% o más de los resultados negativos

Tabla 11. Caracteres bioquímicos diferenciales entre *Citrobacter freundii*, *C. koseri* y *C. amalonaticus*

Pruebas bioquímicas	<i>C. freundii</i>	<i>C. koseri</i>	<i>C. amalonaticus</i>
SH ₂	+ ^a	- ^b	-
Indol	-	+	+
Malonato (fermentación)	-	+	-
Ornitina descarboxilasa	d ^c	+	+
Adonitol (fermentación)	-	+	-
Melibiosa (fermentación)	+	-	-

^a 90% o más de los resultados positivos, ^b 90% o más de los resultados negativos, ^c Diferentes reacciones

Tabla 12. Caracteres bioquímicos diferenciales entre los distintos miembros del género *Citrobacter*

Especie	Indol	ODC	Fermentación				
			Malonato	Sacarosa	Dulcitol	Melibiosa	Adonitol
<i>C. amnolaticus</i>	+ ^a	+	- ^b	-	-	-	-
<i>C. braakii</i>	d ^c	+	-	-	d	d	-
<i>C. farmeri</i>	+	+	-	+	-	+	-
<i>C. freundii</i>	d	-	-	+	-	+	-
<i>C. koseri</i>	+	+	+	d	d	-	+
<i>C. rodentium</i>	-	+	+	-	-	-	-
<i>C. sedlakii</i>	d	+	+	-	+	+	-
<i>C. werkmannii</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>C. youngae</i>	d	-	-	d	+	-	-
<i>C. gilleni</i>	-	-	+	d	-	d	-
<i>C. murlinae</i>	+	-	-	d	+	d	-

^(a) 90% o más de los resultados positivos, ^(b) 90% o más de los resultados negativos, ^(c) Diferentes reacciones

Sensibilidad a los antibióticos

El género *Citrobacter*, al igual el resto de las *Enterobacteriaceae*, es resistente natural a macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, glucopéptidos, rifampicina y ácido fusídico. La resistencia natural a antibióticos β -lactámicos depende de la especie. *Citrobacter freundii* tiene una β -lactamasa cromosómica inducible de clase C de Ambler (Amp-C). Esta enzima en condiciones basales, se sintetiza en cantidades mínimas, pero en presencia de un β -lactámico inductor, se comienza a producir en grandes cantidades. El

fenómeno de inducción es reversible y cuando el inductor desaparece, la producción de la enzima vuelve al estado basal. Esto implica que antibióticos lábiles a la acción de la enzima pero buenos inductores como ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas de primera generación y cefoxitina van a aparecer como resistentes en el fenotipo Amp-C inducible. Como mecanismo adquirido de resistencia, se puede producir una mutación en uno de los genes involucrados en la regulación de la síntesis de Amp-C, lo que puede producir desrepresión, con una producción continua de grandes cantidades de enzima. Este fenómeno fenotípicamente se verá como resistencia a carboxipenicilinas, acilureído penicilinas, cefalosporinas de tercera generación y monobactames, dejando sensibles a las cefalosporinas de cuarta generación (cefepime) y los carbapenemes²⁸. Algunos autores recomiendan no utilizar cefalosporinas de tercera generación o aztreonam en infecciones causadas por microorganismos productores de Amp-C, por el riesgo de selección de mutantes desreprimidos (que ocurren con una frecuencia de $1/10^{5-7}$), salvo en infecciones urinarias no complicadas donde el riesgo de selección es mínimo. Si bien la desrepresión de la Amp-C no determina resistencia a los carbapenemes, la combinación de este mecanismo con el de impermeabilidad de la membrana externa (deficiencia de porinas) puede conferir resistencia a este tipo de drogas²⁸.

A diferencia de *C. freundii*, *C. koseri* no produce Amp-C, sino que produce una cefuroxímasa inducible de clase A de Ambler. El fenotipo que presentan estos aislamientos es de resistencia a aminopenicilinas y sensibilidad variable a las cefalosporinas de primera y segunda generación. Las mutantes desreprimidas de la cefuroxímasa de *C. koseri* son muy infrecuentes. Cuando se presentan conservan la sensibilidad a cefoxitina,

ceftacídima y aztreonám y la resistencia conferida al resto de los antibióticos β -lactámicos es totalmente revertida por los inhibidores de β -lactamasas²⁸.

C. amalonaticus no posee ninguna enzima cromosómica que le confiera resistencia intrínseca a los antibióticos β -lactámicos, por lo que se presenta naturalmente sensible a los mismos.

La resistencia adquirida a cefalosporinas de tercera generación en *C. freundii* se debe principalmente a la hiperproducción de Amp-C (57%) y en menor medida a la presencia de BLEE (del tipo SHV, CTX-M, PER y BLEE derivadas de TEM)^{47, 43}. Por otra parte, en los últimos tiempos, se ha asociado la resistencia a carbapenemes, con la adquisición de carbapenemasas, principalmente serincarbapenemasas del tipo KPC⁶⁵ y en menor medida metalcarbapenemasas (VIM, IMP y NDM)y enzimas del tipo OXA-48^{48, 51, 34}.

Bibliografía

1. Abbott SL, Janda JM. The genus *Edwardsiella*. En:Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E, editors. The Prokaryotes. Springer, 2006, p. 72-89.
2. Agbaje M, Begum RH, Oyekunle MA, Ojo OE, Adenubi OT. Evolution of *Salmonella* nomenclature: a critical note. Folia Microbiol. 2011; 56: 497-503.
3. Al Naiemi N, Zwart B, Rijnsburger MC, Roosendaal R, Debets-Ossenkopp YJ, Mulder JA, Fijen CA, Maten W, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Extended-spectrum-beta-lactamase production in a *Salmonella enterica* serotype Typhi strain from the Philippines. J Clin Microbiol. 2008; 46: 2794-5.
4. Arlet G, Barrett TJ, Butaye P, Cloeckeaert A, Mulvey MR, White DG. *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. Microb Infect. 2006; 8:1945-54.

5. Armand-Lefevre L, Leflon-Guibout V, Bredin J, Barguelli F, Amor A, Pagès JM, Nicolas-Chanoine MH. Imipenem resistance in *Salmonella enterica* serovar Wein related to porin loss and CMY-4 β -lactamase production. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47:1165-8.
6. Bauernfeind A, Stemmlinger I, Jungwirth R, Mangold P, Amann S, Akalin E, Ang O, Bal C, Casellas JM. Characterization of β -Lactamase gene *bla*PER-2, which encodes an extended-spectrum class A β -Lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40:616-20.
7. Bijlsma JJ, Groisman EA. The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol*. 2005; 57: 85-96.
8. Braam P. Salmonellosis. En: Heyman DL, editor. *El Control de las enfermedades transmisibles*, 18a edición. Washington DC: OPS, Publicación Científica y Técnica N° 613, 2005, p. 568-73.
9. Brenner DJ, O'Hara CM, Grimont PAD, Janda JM, Falsen E, Aldova E, Ageron E, Schindler J, Abbott SL, Steigerwalt AG. Biochemical identification of *Citrobacter* species defined by DNA hybridization and description of *Citrobacter gillenii* sp. nov. (formely *Citrobacter* genomospecies 10) and *Citrobacter murlinae* sp. nov. (formely *Citrobacter* genomospecies 11). *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 2619-24.
10. Campos J, Pichel M, Ibelli Vaz T, Tavechio A, Fernandes SA, Muñoz N, Rodriguez C, Realpe ME, Moreno J, Araya P, Fernández J, Fernández A, Campos E, Duarte F, Weiler Gustafson N, Binsztein N, Pérez Gutierrez E. Building PulseNet Latin American and Caribbean *Salmonella* Regional Database: first conclusions of genetic subtypes of *S. Typhi*, *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* circulating in six countries of the region. *Food Res Int*. 2011; 45: 1030-6.
11. Chaignat C. Fiebre tifoidea. Fiebre paratifoidea. En: Heyman DL, editor. *El control de las enfermedades transmisibles*, 18a ed. Washington DC: OPS, Publicación Científica y Técnica N° 613, 2005, p. 287-95.
12. Chiu CH, Wu TL, Su LH, Chu C, Chia JH, Kuo AJ, Chien MS, Lin TY. The emergence in Taiwan of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis. *N Engl J Med*. 2002; 346:413-9.

13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21th informational supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA, USA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
14. de Toro M, Rojo-Bezares B, Vinue L, Undabeitia E, Torres C, Saenz Y. In vivo selection of *aac(6)-Ib-cr* and mutations in the *gyrA* gene in a clinical *qnrS1*-positive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104B strain recovered after fluoroquinolone treatment. J Antimicrob Chemother. 2010; 65:1945–9.
15. Ewing, WH. The genus *Salmonella*. En: Edwards and Ewing's. Identification of *Enterobacteriaceae*, 4th edition. New York, NY, USA, Elsevier Science Publishing Co. Inc., 1986, p. 181-340.
16. Foley SL, Lynne AM. Food animal-associated salmonella challenges: Pathogenicity and antimicrobial resistance. J Animal Science. 2008; 86:173-8.
17. Gales AC, Sader HS, Mendes RE, Jones RN. *Salmonella* spp. isolates causing bloodstream infections in Latin America: report of antimicrobial activity from SENTRY antimicrobial surveillance program (1997–2000). Diagn Microbiol Infect Dis. 2002; 44:313-8.
18. Gokul BN, Menezes GA, Harish BN. ACC-1 beta-Lactamase-producing *Salmonella enterica* Serovar Typhi, India. Emerg Infect Dis. 2010; 16:1170-1.
19. Golub V, Kim AC, Krol V. Surgical wound infection, tuboovarian abscess, and sepsis caused by *Edwardsiella tarda*: case reports and literature review. Infection. 2010; 38:487-9.
20. Gray JT, Fedorka-Cray PJ. *Salmonella*. En: Cliver DO, Riemann HP, editors. Foodborne diseases. San Diego, USA, Academic Press, 2002, p. 55-68.
21. Grimont PAD, Weill FX. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th edition, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur, París, Francia, 2007.
22. Humphries RM, Fang FC, Aarestrup FM, Hindler JA. In vitro susceptibility testing of fluoroquinolone activity against *Salmonella*: recent changes to CLSI standards. Clin Infect Dis. 2012; 55:1107-13.
23. Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA, Van Duyne MS, Kubota K, Graves L, Wrigley D, Barrett T, Ribot E. Establishment of a universal size standard strain for use with the

- PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 1045-50.
24. Janda JM, Abbott SL. Infections associated with the genus *Edwardsiella*: the role of *Edwardsiella tarda* in human disease. *Clin Infect Dis.* 1993; 17: 742-8.
 25. Kawai T, Kusakabe H, Seki A, Kobayashi S, Onodera M. Surgical wound infection, tuboovarian abscess, and sepsis caused by *Edwardsiella tarda*: case reports and literature review. *Infection.* 2011; 39:171-3.
 26. Le Minor L, Popoff MY. Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Bacteriol.* 1987; 37: 465-8.
 27. Lindberg AA, Le Minor L. Serology of *Salmonella*. En: Bergan T, editor. *Methods in Microbiology*. London, UK, Academic Press (INC), 1984, p.1-63.
 28. Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995; 8:557-84.
 29. Lucero C, Galas M, Tuduri E, Volcovich R, Vázquez M, Red Whonet Argentina y Corso A. 16 años de vigilancia nacional de la resistencia a los antimicrobianos en *Salmonella* spp. XII Congreso Argentino de Microbiología. Resumen 28164. *Rev Argent Microbiol* 2010; 42 Supl 1: 261.
 30. Manganello S, Tayara A, Perazzi B, Neira L, Famiglietti A, Pugliese L, Santini P, Vay C. Caracterización y distribución de especies de *Citrobacter* en un hospital universitario. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2001; 19: 11-4.
 31. Martínez-Lage JF, Martínez-Lage Azorín L, Almagro MJ, Bastida ME, Reyes S, Tellez C. *Citrobacter koseri* meningitis: a neurosurgical condition? *Eur J Paediatr Neurol.* 2010; 14: 360-3.
 32. Miriagou V, Tzouvelekis LS, Rossiter S, Tzelepi E, Angulo FJ, Whichard JM. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47:1297-300.
 33. Mweu E, English M. Typhoid fever in children in Africa. *Trop Med Int Health.* 2008; 13:532–40.

34. Nazic H, Poirel L, Nordmann P. Further identification of plasmid-mediated quinoloneristance determinant in *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 2146–7.
35. Nelson JJ, Nelson CA, Carter JE. Extraintestinal manifestations of *Edwardsiella tarda* infection: a 10-year retrospective review. *J LA State Med Soc.* 2009; 161: 103-6.
36. Ohl ME, Miller SI. *Salmonella*: A model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med* 2001; 52: 259-74.
37. Old DC, Therlfall EJ. *Salmonella*. En: Leslie Collier L, Balows A, Sussman M, editors. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 9th edition. United Kingdom, John Wiley and Sons, Inc., 1999, Vol. 2, Chapter 41, p. 983-5.
38. Orman BE, Piñeiro SA, Arduino S, Galas M, Melano R, Caffer MI, Sordelli DO, Centrón D. Evolution of multiresistance in nontyphoid *Salmonella* serovars from 1984 to 1998 in Argentina. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2002; 46:3963-70.
39. Parry CM. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica*. *Curr Opin Infect Dis.* 2003; 16:467-72.
40. Parry CM, Threlfall EJ. Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal *Salmonellae*. *Curr Opin Infect Dis.* 2008; 21:531-8.
41. Parry CM, Wijedoru L, Arjyal A, Baker S. The utility of diagnostic tests for enteric fever in endemic locations. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011; 9: 711-25.
42. Parry CM. Epidemiological and clinical aspects of human typhoid fever. En: Mastroeni P, Maskell D, editors. *Salmonella infections: Clinical, immunological and molecular aspects.* New York, Cambridge University Press, 2006, p.1-18.
43. Pepperell C, Kus JV, Gardam MA, Humar A, Burrows LL. Low-virulence *Citrobacter* species encode resistance to multiple antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46: 3555–60.
44. Pfeifer Y, Matten J, Rabsch W. *Salmonella enterica* serovar Typhi with CTX-M beta-lactamase, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15:1533-5.
45. Pichel M, Binsztein N. Principios y aplicaciones de electroforesis en campo pulsado (PFGE). En: Merino LA, Giusiano G, editores. *Manual de métodos moleculares para estudios microbiológicos.* Buenos Aires, AAM, 2011, p. 27-8.

46. Pichel M, Binsztein N. Tipificación epidemiológica de *Salmonella* spp. mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE). En Merino LA, Giusiano G, editores. Manual de métodos moleculares para estudios microbiológicos. Buenos Aires, AAM, 2011, p. 220-4.
47. Potz N, Hope R, Warner M, Johnson AP, Livermore DM, on behalf of the London & South East ESBL Project Group. Prevalence and mechanisms of cephalosporin resistance in *Enterobacteriaceae* in London and South-East England. J Antimicrob Chemother. 2006; 58:320– 6.
48. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. Clin Microbiol Rev. 2007; 20:440-58.
49. Rapoport M, Monzani V, Pasterán F, Morvay L, Faccone D, Petroni A, Galas M. CMY-2-type plasmid-mediated AmpC beta-lactamase finally emerging in Argentina. Int J Antimicrob Agents. 2008; 31:385-7.
50. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathog Dis. 2006; 3: 59-67.
51. Rimrang B, Chanawong A, Lulitanond A, Wilailuckana C, Charoensri N, Sribenjalux P, Phumsrikaew W, Wonglakorn L, Kerdsin A, Chetchotisakd P. Emergence of NDM-1- and IMP-14a-producing *Enterobacteriaceae* in Thailand. J Antimicrob Chemother. 2012; 67:2626-30.
52. Rotimi VO, Jamal W, Pal T, Sovenned A, Albert MJ. Emergence of CTX-M-15 type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella* spp. in Kuwait and the United Arab Emirates. J Med Microbiol. 2008; 57:881-6.
53. Salve A, Pichel M, Wiesner M, Hidalgo M, Terragno R, Alvarez A, Agudelo CI, Castañeda E, Binsztein N. Molecular subtyping of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates from Colombia and Argentina. Foodborne Pathog Dis. 2006; 3: 142-52.
54. Samonis G, Karageorgopoulos DE, Kofteridis DP, Matthaiou DK, Sidiropoulou V, Maraki S, Falagas ME. *Citrobacter* infections in a general hospital: characteristics and outcomes. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009; 28: 61-8.

55. Stock I, Wiedemann B. Natural antibiotic susceptibilities of *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri*, and *E. hoshinae*. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45: 2245-55.
56. Su LH, Chiu CH, Chu C, Wang MH, Chia JH, Wu TL. In-vivo acquisition of ceftriaxone resistance in *Salmonella enterica* serotype Anatum. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47:563-7.
57. Su LH, Chiu CH, Chu C, y Ou JT. Antimicrobial resistance in nontyphoid *Salmonella* serotypes: a global challenge. Clin Infect Dis. 2004; 39:546-51.
58. Swaminathan B, Barrett T, Hunter S, Tauxe R. Pulsenet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. Emerg Infect Dis. 2001; 7: 382-9.
59. Tibbetts RJ, Lin TL, Wu CC. Phenotypic evidence for inducible multiple antimicrobial resistance in *Salmonella choleraesuis*. FEMS Microbiology Lett. 2003; 218:333-8.
60. Tindal BJ, Grimont PAD, Garrity GM, Euzéby JP. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. Int J Syst Evol Microbiol. 2005; 55: 521-4.
61. van Asten AJAM, van Dijk JE. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005; 44: 251-9.
62. van Ooij C. Bacterial pathogenesis: opening the gates of type III secretion. Nat Rev Microbiol. 2010; 8: 389.
63. Weinbergera M, Kellerb N. Recent trends in the epidemiology of non-typhoid *Salmonella* and antimicrobial resistance: the Israeli experience and worldwide review. Curr Opin Infect Dis. 2005; 18: 513-21.
64. Yagi T, Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Doi Y, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Arakawa Y. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2005; 43: 2551-8.
65. Zhang R, Yang L, Cai JC, Zhou HW, Chen GX. High-level carbapenem resistance in a *Citrobacter freundii* clinical isolate is due to a combination of KPC-2 production and decreased porin expression. J Med Microbiol. 2008; 57: 332-7.

Capítulo II.c.1.5

Proteus, Morganella y Providencia

MARINA BOTTIGLIERI

Profesora Adjunta de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Medicina.
Universidad Católica de Córdoba
Jefa del Servicio de Microbiología de la Clínica Universitaria Reina Fabiola,

LYDIA CARVAJAL

Bioquímica Especialista en Bacteriología
Ex Jefa del Laboratorio de Bacteriología del Hospital de Niños de Córdoba

Introducción

Los géneros *Proteus*, *Morganella* y *Providencia* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y los microorganismos de estos géneros cumplen con la definición de dicha familia⁶⁴.

Son bacilos gram negativos móviles con flagelos peritricos. Poseen los dos tipos de metabolismo, respiratorio y fermentativo, y son considerados anaerobios facultativos y quimioorganótrofos.

Se caracterizan por desaminar oxidativamente la fenilalanina y el triptófano. Hidrolizan la tirosina, no fermentan la lactosa, desdoblan la urea a excepción de algunas especies de *Providencia* y son resistentes a la colistina⁶⁴.

Son ubicuos, están ampliamente distribuidos en la naturaleza, en el suelo, en el agua, en alimentos contaminados y forman parte de la microbiota habitual del intestino del hombre y de los animales.

Se los relaciona principalmente con infecciones del tracto urinario. Se considera que al alcalinizar la orina, por hidrólisis de la urea, actúan como promotores de litiasis generando una obstrucción de las vías urinarias por cálculos que sirven como nichos para la persistencia de la infección. Tanto *Proteus* como *Providencia* tienden a provocar infecciones crónicas y causar destrucción del parénquima renal³⁰.

Estos microorganismos son patógenos oportunistas y agentes causales de infecciones de la comunidad y asociadas al cuidado de la salud^{1, 13}.

Aspectos taxonómicos

La taxonomía de estos géneros es complicada y ha sido objeto de numerosos cambios a lo largo de la historia. Debido a que las especies de *Proteus*, *Providencia* y *Morganella* se han clasificado en diferentes géneros a través del tiempo, su evolución taxonómica es algo confusa. Históricamente estos tres géneros fueron colocados en la tribu *Proteeae* y aunque la designación de tribu no es usada frecuentemente, en algunos casos resulta de utilidad⁵⁹. El uso de métodos filogenéticos moleculares de clasificación permitió que varias especies fueran reasignadas en géneros separados basados en la relación de su ADN.

El género *Proteus* está constituido por cinco especies: *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Proteus hauseri* y *Proteus myxofaciens* y 3 genomoespecies innominadas, diferenciadas por técnicas de biología molecular (*Proteus* genomoespecies 4, 5 y 6).

El género *Providencia* presenta cinco especies: *Providencia alcalifaciens*, *Providencia heimbachae*, *Providencia rettgeri*, *Providencia rustigianii* y *Providencia stuartii*^{1, 52}.

El género *Morganella* actualmente presenta una sola especie: *Morganella morganii*, con dos subespecies, *M. morganii* subsp. *morganii* y *M. morganii* subsp. *sibonii*. En el año 2006 Jette Emborg y col. propusieron a *Morganella psychrotolerans* sp. nov. como una nueva especie¹⁷.

Antes del advenimiento de la clasificación basada en estudios moleculares, se utilizaron un grupo de pruebas bioquímicas, que aún están vigentes, para la identificación de estos géneros (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Características bioquímicas comunes a los géneros *Proteus*, *Morganella* y *Providencia*.

Prueba	<i>Proteus</i>	<i>Morganella</i>	<i>Providencia</i>
Arginina dihidrolasa	-	-	-
Lisina descarboxilasa	-	-	-
Ornitina desaminasa	+	+	+
Fenilalanina desaminasa	+	+	+
Crecimiento en KCN	+	+	+
Ácido de D-glucosa	+	+	+
Ácido de melibiosa	-	-	-
Reducción de nitratos a nitritos	+	+	+
Producción de oxidasa	-	-	-
Producción de ONPG	-	-	-
Utilización de pectato	-	-	-
Utilización de tartrato	+	+	+
Resistencia a polimixina	+	+	+

KCN: cianuro de potasio; ONPG: o-nitrofenil β -D-galactopiranosido

Tabla 2. Características bioquímicas diferenciales de los géneros *Proteus*, *Morganella* y *Providencia*^a

Prueba	<i>Proteus</i>	<i>Morganella</i>	<i>Providencia</i>
<i>Swarming</i>	+	-	-
Producción de SH ₂	+	-	-
Hidrólisis de gelatina	+	-	-
Lipasa (aceite de maíz)	+	-	-
Citrato de Simmons	v	-	+
Ornitina descarboxilasa	v	+	-
Ácido de D-manosa	-	+	+
Ácido de maltosa	v	-	-
Ácido de D-manitol	-	-	+ ^b
Ácido de D-arabitol	-	-	+ ^{b, c}

Ácido de eritritol	-	-	+ ^{b, d}
Hdrólisis de gelatina	+	-	-

^aTemperatura de la reacción: 36°C ± 1°C. Todas las lecturas a las 48 h. v, variable (11-89%); +, ≥ 90%; -, ≤ 10%. ^b *P. rustigianii* no produce ácido de alcoholes polihídricos. ^c Negativa para *P. stuartii*. ^d Variable para *P. stuartii*.

Si bien las pruebas fenotípicas de desaminación oxidativa de aminoácidos pueden ser similares a las observadas con otras enterobacterias, la producción de un pigmento marrón cuando el desarrollo se efectúa en un medio con 5 % de triptófano y la degradación de la tirosina, son características de los miembros de esta tribu. Rara vez también pueden observarse en otras enterobacterias.

Género *Proteus*

El nombre *Proteus* hace referencia a la capacidad de estos microorganismos de cambiar de forma, como Proteo, antiguo dios del mar descrito por Homero en la Odisea, quien era capaz de transformarse para evitar su captura. Típicamente aparecen como bacilos de 0,4 a 0,6 µm por 1 a 3 µm, pero también pueden disponerse como cocobacilos aislados o en cadenas y las formas jóvenes pueden ser filamentosas.

Como se dijo, el género *Proteus* contiene actualmente 5 especies y 3 genomoespecies (*Proteus* genomoespecies 4, 5 y 6). Estas últimas y *P. vulgaris sensu stricto* forman el complejo *P. vulgaris*⁹.

Estas bacterias fueron descritas en 1885 por Gustav Hauser quien originalmente definió dos especies: *P. mirabilis* y *P. vulgaris*. En 1966 se describió una nueva especie, *P. myxofaciens*, productora de biopelículas

(*biofilms*). Fue aislada de la larva de una mariposa (*Portheticadispar*) y se desconoce si ha habido algún aislamiento en humanos. Análisis filogenéticos recientes sugieren la reclasificación de esta especie en un nuevo género, *Cosenzaea* gen. nov. con una sola especie *Cosenzaea myxofaciens* comb. nov.²².

En 1978 se demostró la heterogeneidad genética de *P. vulgaris*. Un grupo de cepas indol, salicina y esculina negativas fue designado como *P. vulgaris* biogrupo 1 y en 1982 dicho grupo fue renombrado como *P. penneri*²⁷. *P. vulgaris* presenta en la actualidad dos biogrupos, biogrupo 2 y biogrupo 3 que pueden ser diferenciados por pruebas bioquímicas⁶⁴.

O'Hara y col. en el año 2000 propusieron finalmente la denominación de *P. hauseri* a la genomoespecie 3 en honor a Gustav Hauser, el microbiólogo alemán que describió el género por primera vez. Se desconoce el hábitat y el poder patógeno de esta especie⁶⁰.

La estructura antigénica de *Proteus* está compuesta por los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K), los cuales se utilizan para diferenciar los serovares. El antígeno flagelar H contribuye a la capacidad invasora de las vías urinarias. Las cadenas polisacáridicas del LPS de las especies de *Proteus* contienen las suficientes diferencias estructurales como para permitir agrupar a las cepas de *P. mirabilis*, *P. vulgaris* y *P. penneri* en serogrupos, en base a su aglutinación frente a los anticuerpos dirigidos contra estas estructuras^{98, 100}.

De acuerdo a la especificidad serológica de los antígenos O, las cepas de las dos especies *P. mirabilis* y *P. vulgaris* fueron clasificadas en 60

serogrupos O. Para *P. penneri* se propusieron posteriormente otros 15 serogrupos O^{64, 76}.

Debe tenerse en cuenta que los antígenos O de *Proteaeae* muestran reacciones cruzadas con antígenos O de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. o *Escherichia coli*, lo cual puede conducir a confusiones en los cultivos de heces en el laboratorio cuando se emplean sueros aglutinantes para la identificación primaria de aislamientos sospechosos de enteropatógenos (Leardini N., comunicación personal).

Habitat

Las especies del género *Proteus*, a excepción de *P. myxofaciens* y de *P. hauseri*, están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se aíslan del suelo, agua, del intestino del hombre y de numerosas especies animales (ratas, perros, gatos, bovinos, porcinos, pájaros, reptiles). En la naturaleza estas bacterias juegan un rol importante en la degradación de la materia orgánica de origen animal.

Aspectos patogénicos

Al menos 10 factores potenciales de virulencia contribuyen a la patogenicidad de *Proteus* spp. Estos pueden dividirse en dos grupos:

1. Estructuras de superficie que incluyen flagelos y su asociación con el fenómeno de *swarming*, varios tipos de fimbrias, lipopolisacárido, proteínas de membrana externa y cápsula.

2. Proteínas, enzimas y otros productos secretados, entre los cuales se destacan la ureasa, una proteasa ZapA, que degrada específicamente inmunoglobulinas IgA e IgG, hemolisinas y la formación de biopelículas^{8, 52} (Tabla 3).

Factores de virulencia relevantes

Una característica fenotípica importante de los miembros del género *Proteus* es su capacidad de desplazarse, en medios sólidos con gelatina o agar, desde el punto de inoculación, para diseminarse sobre la superficie del medio. Este fenómeno, conocido como *swarming*, es atribuido a la naturaleza dimórfica de la bacteria y es el resultado de un comportamiento grupal de las mismas en la periferia de las colonias, donde unos microorganismos se desplazan sobre sus vecinos.

Este fenómeno ocurre en tres fases: diferenciación, migración y consolidación. En la primera fase, al crecer en medios líquidos, aparecen como bacilos cortos y aislados con 6 a 10 flagelos peritricos; al ser transferidos a medios sólidos sufren alteraciones ultraestructurales y se convierten en células largas y no septadas, con un gran aumento del número de flagelos (más de 1.000) denominadas células *swarmer*. En la segunda fase estas células se mueven al unísono en todas las direcciones desde el sitio original de inoculación durante un período que dura varias horas e inician el

desplazamiento a partir del borde de la colonia. Cuando el movimiento cesa tiene lugar la tercera fase, de consolidación, durante la cual las bacterias filamentosas reinician la división activa para dar nuevamente lugar a las formas cortas; en este período la masa de bacterias aumenta en ese punto donde se detuvo la colonia, por lo que el borde se observa más grueso. Luego se inicia otro ciclo de diferenciación, migración y consolidación dando a la colonia su aspecto característico. La diferenciación en células *swarmer* está asociada con un marcado aumento en la síntesis del lipopolisacárido con largos polímeros O y una mayor fluidez de la membrana externa. Por otro lado, la producción extracelular de biopelículas y del polisacárido capsular, facilita su migración al formar un fino capullo que cubre a estas células. Las células *swarmer* son formas virulentas de *Proteus* y durante su diferenciación ocurre un aumento coordinado en la síntesis de ureasa, hemolisinas y proteasas^{52, 54, 64}.

Fimbrias y capacidad de adherencia

La adhesión bacteriana a la superficie epitelial es el principal factor de virulencia y está asociada a la presencia de fimbrias. Este mecanismo es el primer paso para el desarrollo de una infección del tracto urinario (ITU)^{18, 76}. En los últimos años se han realizado numerosas investigaciones de las estructuras de superficie de *P. mirabilis*, *P. vulgaris* y *P. penneri* que resultaron en un mejor conocimiento de los mecanismos patogénicos de estos microorganismos. *P. mirabilis* representa un caso particular en el cual pueden expresarse varios tipos de fimbrias simultáneamente^{56, 72, 73}. Las más extensamente estudiadas

han sido las fimbrias MR/P (*mannose-resistant Proteus-like*), también conocidas como fimbrias tipo IV. Son proteínas altamente inmunogénicas de 7 mm de diámetro que están asociadas con la colonización de la región superior del tracto urinario⁶⁴.

Tabla 3. Factores de virulencia asociados a *Proteus* spp.⁸

Factor de virulencia	Contribución a la patogenicidad
Fimbrias	Adherencia a tejidos y material protésico
Flagelos	Movilidad ascendente desde el uréter al riñón
Ureasa	Desdoblamiento de la urea. Alcalinización del pH de la orina. Formación de cálculos de estruvita. Citotoxicidad
Proteasas	Proteasas de IgA
Desaminasas	Producción de α -cetoácidos que actúan como sideróforos
Invasividad	Internalización en células del hospedador
Hemolisinas	Adherencia e invasión celular. Citotoxicidad
Polisacárido capsular	Formación de <i>biofilms</i> . Nucleación de cálculos
Lipopolisacárido	Endotoxicidad. Resistencia al suero

Las hemagglutininas tipo 3 MR/K(*mannose-resistant Klebsiella-like*), son semejantes a las fimbrias manosa resistentes de *Klebsiella* spp.(de allí su nombre) y se han asociado a la capacidad de aglutinar eritrocitos tratados con ácido tánico de varias especies animales. Las hemagglutininas MR/K son más características de *P. penneri* que de *P. mirabilis*⁷⁵. Las cepas con este tipo de hemagglutininas MR/K están fuertemente asociadas con la adherencia a los catéteres y con la persistencia de bacteriuria relacionada con sondas de larga permanencia²⁸.

Otro tipo de fimbrias son las denominadas PMF (por *P. mirabilis* fimbriae), las fimbrias ATF (por *ambiental temperature fimbriae*) y las NAF (por *nonagglutinant fimbriae*), también conocidas como UCA (*uroepithelial cell adhesins*). Se ha sugerido que las PMF son importantes en la colonización de la vejiga pero no del riñón. Las NAF/UCA son fimbrias que carecen de las propiedades aglutinantes de MR/P o MR/K pero adhieren a las células uroepiteliales, lo que indica su posible importancia como un factor de virulencia para establecer la infección del tracto urinario^{72,73}.

Existen islas de patogenicidad que contribuyen a la variabilidad genómica y a la virulencia de los patógenos bacterianos. Flannery et al. identificaron una nueva isla de 94-kb designada ICEPm1 que es común a *P. mirabilis*, *P. stuartii* y *M. morganii*. ICEPm1 transporta factores de virulencia importantes para la colonización del tracto urinario que incluyen una toxina, la aglutinina tóxica de *Proteus* (Pta). Esta isla de patogenicidad es más prevalente en aislamientos urinarios de *P. mirabilis*, en comparación con cepas recuperadas de otras partes del cuerpo, lo que sugiere la contribución de la misma a las infecciones del tracto urinario. Las bacterias uropatógenas se encuentran principalmente colonizando el tracto gastrointestinal y la presencia de ICEPm1 puede ser un factor determinante en la colonización del tracto urinario¹⁹.

Biopelícula

Está bien documentada la formación de una biopelícula cristalina sobre la superficie del catéter por parte de *P. mirabilis*. Jansen y col. demostraron el rol de las fimbrias MR/P y su contribución a la formación de esta estructura de adherencia. Utilizando cepas con capacidad para expresar este tipo de fimbrias y otras que no la presentaron, comprobaron que a las 18 horas de iniciado el proceso, con las primeras se logró una estructura tridimensional que no se obtuvo con las cepas carentes de este tipo de fimbrias. Esta biopelícula permite la persistencia de *P. mirabilis* en el tracto urinario, protegiéndolo de la acción de los antimicrobianos y de la respuesta inmune del huésped y contribuye además a la adherencia a la superficie del catéter. La formación de cálculos urinarios durante la infección por *P. mirabilis* es también crítica para el desarrollo de esta biopelícula³⁰. Por otro lado, se la ha relacionado con el incremento de la resistencia a los antibióticos²⁶.

Flagelos

La movilidad facilita la colonización y la diseminación bacteriana. La proteína constitutiva de los mismos, la flagelina, es fuertemente inmunogénica (antígeno H) y genera la síntesis de anticuerpos que se fijan a los flagelos inmovilizando a las bacterias. *In vitro* se pudo demostrar que la presencia de estos anticuerpos provoca un cambio en la antigenicidad de los flagelos permitiendo que las bacterias escapen a la respuesta inmune. Este mecanismo podría protegerlas de la acción de la inmunoglobulina A permitiendo así la colonización del tracto urinario por las mismas.

Ureasa

Como es bien sabido, un hecho distintivo de *Proteus* spp. es la producción de ureasa, importante criterio taxonómico que diferencia este género de otras enterobacterias. Todas las especies del género *Morganella* y algunas de *Providencia* también son productoras de esta enzima. Es constitutiva en la mayoría de las cepas de *P. mirabilis* e inducible en *P. vulgaris* y *P. penneri* y tiene un rol importante en el desarrollo de la infección del tracto urinario. Se relaciona con procesos de urolitiasis infectiva y cistitis alcalina incrustante asociados a cálculos de estruvita. La ureasa es capaz de desdoblar eficazmente la urea presente en la orina y producir la alcalinización de la misma por producción de amoníaco y dióxido de carbono. Con la alcalinización precipitan los iones Mg^{+2} y Ca^{+2} que habitualmente son solubles a pH urinario fisiológico y como consecuencia de ello se producen los cálculos de estruvita ($MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$). La presencia de exopolisacáridos en la orina y la posibilidad de crecimiento en biopelículas facilita los procesos de nucleación de los cálculos. Aunque este efecto se ha asociado mayoritariamente a *P. mirabilis*, también se ha observado en *P. vulgaris* y *P. penneri*. La ureasa desempeña también un rol importante en el desarrollo de lesiones renales debido a su actividad citotóxica de las células de los túbulos contorneados proximales^{18, 52, 64, 76}.

Proteasas IgA e IgG

Proteus está entre los géneros capaces de producir enzimas proteolíticas que actúan degradando las inmunoglobulinas séricas IgA1, IgA2 e IgG. Sin embargo, su rol como factor de virulencia en las infecciones del tracto urinario permanece incierto. Se describió asimismo un polipéptido con actividad de proteasa secretado por cepas uropatógenas de *P. mirabilis* que aumenta la capacidad de esta bacteria para infectar el tracto urinario⁶⁴.

Hemolisinas

Las hemolisinas producen la destrucción de los eritrocitos durante la infección y contribuyen a la invasividad y patogenicidad bacteriana. *Proteus* produce dos hemolisinas diferentes, HlyA y HpmA. La hemolisina HlyA, al igual que la α -hemolisina de *E. coli*, está regulada genéticamente y es una citotoxina formadora de poros dependiente de Ca^{+2} . La HpmA está relacionada a la hemolisina ShIA de *Serratia marcescens* y es independiente de Ca^{+2} . Casi todas las cepas de *P. vulgaris* y *P. mirabilis* producen la hemolisina HpmA pero solamente una pocas cepas de *P. vulgaris* producen la HlyA. La mayoría de las cepas de *P. penneri* producen ambas toxinas. En ensayos *in vitro* se demostró

que la capacidad de invasión celular que exhibe *P. penneri* también depende de la producción de hemolisinas y del efecto citotóxico asociado^{52, 64, 76}.

Lipopolisacárido (LPS) y proteínas de membrana externa

El LPS bacteriano es una endotoxina que presenta el antígeno O, uno de los blancos más importantes de la respuesta inmune del huésped. Este componente activa a los macrófagos para producir radicales tóxicos de oxígeno, IL1 y factor de necrosis tumoral. El LPS posee las propiedades biológicas clásicas de las endotoxinas, generando fiebre, hipotensión, coagulación intravascular diseminada y *shock*⁶⁴.

Las proteínas de membrana externa constituyen un conjunto de proteínas principales junto a otros componentes de la membrana como el LPS y los fosfolípidos. Las proteínas de membrana externa actúan como un modulador en la interacción del LPS con los macrófagos^{52, 96}.

Cápsula

La cápsula del género *Proteus* presenta antígenos denominados C que son diferentes a los antígenos K de otras enterobacterias. Intervienen en el *swarming* y en la formación de biopelículas⁶⁴.

Otros factores de virulencia

P. mirabilis debe ser capaz de adaptarse al medio ambiente y adquirir nutrientes para lograr persistir y producir una infección. Esto lo logra mediante la producción de enzimas de degradación como las ureasas, proteasas, hemolisinas y proteínas que actúan como sideróforos^{29, 30}.

Significado clínico

Proteus no es un agente etiológico frecuente de infecciones del tracto urinario en pacientes sin enfermedad de base. Numerosos estudios sobre pielonefritis y cistitis no complicadas lo asocian a una baja frecuencia de recuperación. Sin embargo es agente causal de recurrencias en mujeres y muy comúnmente en pacientes con catéteres o anormalidades funcionales o anatómicas del tracto urinario^{3, 13, 63, 99}. El reservorio intestinal facilita una colonización intermitente de la región periuretral que puede llevar a colonizar el catéter y a la subsiguiente infección del tracto urinario. *P. mirabilis* es el segundo agente después de *E. coli* recuperado de bacteriemias secundarias a esta patología. Para establecerse y mantener la infección del tracto urinario y la colonización del catéter, las especies de *Proteus* deben adaptarse y producir una importante cantidad de factores de virulencia que están estrictamente regulados^{13, 30}.

Este microorganismo puede provocar además infecciones de heridas, neumonías, meningitis, osteomielitis, sepsis neonatal, conjuntivitis, úlceras de decúbito, infecciones en el diabético, etc.^{11, 13, 40, 84}. Varios estudios lo relacionan como agente etiológico de otitis media crónica junto a *Pseudomonasaeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. En este contexto, la complicación más grave es el absceso de cerebro^{24, 57}.

Las especies de *Proteus* son agentes causales de una variedad de infecciones asociadas al cuidado de la salud que incluyen neumonías relacionadas a asistencia respiratoria mecánica, infecciones en quemados, infecciones de heridas quirúrgicas, etc.

Una consideración particular merece el rol que juega esta bacteria en las infecciones del pie diabético^{2, 79}. Diversos trabajos mostraron que, después de *Pseudomonas aeruginosa*, *P. mirabilis* y *Klebsiella* spp. son los microorganismos gram negativos aerobios más frecuentemente recuperados. Parvez y col. lo aislaron en el 10,3 % de las muestras de pus, 16,7 % de los tejidos blandos y 18,2 % de hueso. Generalmente estas infecciones son polimicrobianas^{10, 61}.

Se ha sugerido que *P. mirabilis* podría jugar un rol en la etiopatogenia de la artritis reumatoidea ya que se han aislado anticuerpos específicos que sugieren una asociación con esta enfermedad^{14, 70, 71}.

Debido a que *P. mirabilis* es un patógeno oportunista que causa infecciones urinarias en huéspedes con anormalidades anatómicas y/o funcionales del tracto urinario, podría considerarse la prevención mediante vacunas en pacientes con esos factores de riesgo. Li y col. describieron el uso de un componente fimbrial (MrpH) en la composición de la vacuna y lo probaron en ratones utilizando cuatro vías de inoculación: subcutánea, intranasal, oral y transuretral. Se ensayaron compuestos a base de bacterias vivas, bacterias muertas con formalina, fimbrias MR/P purificadas, adhesinas fimbriales MrpH y adhesinas fimbriales MrpH truncadas. La administración intranasal del truncado MrpH demostró en ratones una protección del 75 % en ITU por *P. mirabilis*^{49, 50}.

Identificación a nivel de género y especie

Son bacilos gram negativos rectos de 0,4-0,8µm de ancho x 1,0-3,0 µm de largo, móviles, con flagelos peritricos.

Los microorganismos del género *Proteus* no son bacterias exigentes; en general se aíslan fácilmente de los materiales clínicos en todos los medios no selectivos y en los de selectividad moderada comúnmente utilizados para enterobacterias.

En agar sangre, al igual que otros miembros de *Enterobacteriaceae*, producen colonias mucosas o secas, relativamente grandes, de color gris opaco, con o sin β -hemólisis⁴² (Figura 2). El reconocimiento inicial de estos microorganismos en las placas de cultivo es relativamente sencillo, ya que se caracterizan por su crecimiento en ondas en la superficie del agar formando círculos concéntricos a partir de un botón de inoculación o con una película uniforme o *swarming*¹⁸ (Figura 1).



Figura 1. *Proteus mirabilis* en agar sangre de carnero: Crecimiento en ondas (swarming) de *Proteus mirabilis* en la superficie del medio.

En 1946 Dienes describió un fenómeno producido por cepas de *Proteus mirabilis* productoras de *swarming* que puede ser utilizado con fines epidemiológicos para identificar si ambas cepas son idénticas o no. La prueba consiste en sembrar las dos cepas en estudio en dos puntos diferentes de una placa de agar tripticasa de soja con 5 % de sangre de carnero. Cuando estas son idénticas el desarrollo presenta una penetración de una sobre la otra sin línea de demarcación entre ambas. Por el contrario si las cepas son diferentes, por acción de las bacteriocinas de una y otra, se detiene el crecimiento produciéndose una visible línea de demarcación que las separa. El valor predictivo positivo de esta prueba es mayor que el negativo ya que en algunas ocasiones dos cepas diferentes eventualmente pueden crecer una sobre la otra^{7, 18}.

En medio líquido el crecimiento de esta bacteria produce una turbiedad uniforme con un leve a moderado depósito en el fondo del tubo y olor amoniacal. En los cultivos viejos puede desarrollarse una película fina y frágil en la superficie. *P. myxofaciens* produce una película muy viscosa cuando es cultivado en caldo tripteína de soja y las colonias son hemolíticas en agar sangre.

Teniendo en cuenta la facultad de invadir los medios de cultivo debido al *swarming*, la presencia de *Proteus* hace difícil el aislamiento de otras bacterias presentes en la muestra. Para prevenir esto se han identificado inhibidores tales como sales biliares y detergentes que son incorporados a los medios de cultivo. El cultivo a 43°C, el aumento de la concentración de agar (superior al 3%), la disminución de la concentración de cloruro de sodio como en el medio CLDE (citrate lactose deficient in electrolytes), el agregado de p-

nitrofenilglicerol a concentraciones de 0,1 a 0,3 mM, de alcohol etílico o de azida sódica son otras alternativas propuestas⁶⁴. También se ha mencionado la incorporación de carbón y el aumento de la concentración de agar para reducir el *swarming*. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que con la incubación prolongada puede igualmente aparecer este fenómeno¹⁸.

Los medios utilizados corrientemente para el aislamiento de enterobacterias, agar SalmonellaShigella (SS), agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), agar de Drigalski con el agregado de sales biliares, agar Hektoen, agar Levine y agar MacConkey inhiben la invasión de *Proteus*. En estos medios las colonias son similares a las de *Salmonella*. En SS y XLD las colonias de *P. mirabilis*, *P. vulgaris* y *P. penneri* son incoloras con un centro negro (Figura2). Cuando se observan colonias desprovistas de centro negro generalmente son de *P. penneri*. Sobre agar Hektoen, las colonias tienen una coloración salmón y un centro negro o azul. En agar de Drigalski con sales biliares, las colonias son azuladas, algo iridiscentes y planas.

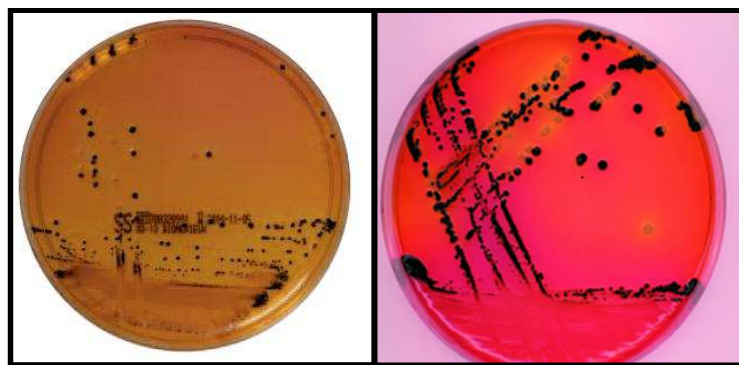


Figura 2.Colonias de *Proteus mirabilis* en agar SS (izquierda) y en agar XLD (derecha)

En los medios utilizados para enriquecimiento de *Salmonella* (selenito de Leifson o tetrationato de Müller-Kauffmann) incubados a 37°C, *Proteus* da un crecimiento similar al de *Salmonella*; en cambio cuando son incubados a 42-43°C su crecimiento es inferior al de dicha bacteria.

Los medios cromogénicos como el CHROMagar Orientator (Becton Dickinson, Sparks, MD), el chromID CPS (bioMérieux, Hazelwood, MO), Chromobrit IU(Britania®), también previenen el *swarming*¹.

Pruebas bioquímicas de identificación

Su identificación no presenta mayores dificultades y se realiza por el estudio de sus características bioquímicas^{9, 59}. Dan positiva la prueba de rojo de metilo y los resultados de las pruebas de producción de indol, citrato de Simmons y Voges-Proskauer son variables. Desaminan oxidativamente la fenilalanina y el triptófano, hidrolizan la urea y son lisina descarboxilasa y arginina dihidrolasa negativos. Solamente *P. mirabilis* descarboxila ornitina. Excepto *P. myxofaciens*, todos descomponen tirosina produciendo un aclaramiento del agar que tenga incorporado este aminoácido. Crecen en caldo con KCN, generalmente producen SH₂ y no utilizan malonato. La glucosa y otros carbohidratos son metabolizados con producción de ácido y generalmente gas. La mayoría produce ácido de glicerol pero no de inositol. Algunas especies fermentan maltosa, sacarosa, trehalosa y D-xilosa.

Las pruebas de utilización del malonato, producción de pigmento amarillo a 25°C y producción de ácido de D-adonitol, L-arabinosa, D-arabitol,

celobiosa, dulcitol, eritritol, mio-inositol, D-manitol, D-manosa, melibiosa, D-sorbitol y mucato son negativas. La temperatura de incubación debe ser de 36 ± 1 °C y la mayoría de las pruebas se tornan positivas a las 48 h. Las cepas del biogrupo 2 de *P. vulgaris* presentan pruebas positivas para indol, salicina y esculina. El biogrupo 3 es indol positivo pero las reacciones de salicina y esculina son negativas^{1, 42}(Tabla 4).

Sistemas comerciales de identificación

Cuando se considera el género en su conjunto la eficiencia en la identificación que realizan los sistemas comerciales automáticos y los paneles de identificación habitualmente utilizados en los laboratorios de microbiología es superior al 95 %. Estos sistemas presentan reacciones químicas fácilmente visibles, una larga vida de almacenamiento, controles de calidad estandarizados y su precisión ha probado ser comparable con la de los sistemas de identificación convencionales⁴¹. Tan solo se describen problemas importantes con *Proteus hauseri*, extremadamente infrecuente en el laboratorio de microbiología clínica⁸.

Algunos de los sistemas más utilizados incluyen API 20E (bioMérieux INC., Hazelwood, MO.), Crystal ID-E/NF (Becton Dickinson Microbiology System, Sparks, Md.), Rapid Neg. ID3 (Dade Behring, Inc., MicroScan, Inc., W. Sacramento, California)⁴².

Los sistemas automatizados se basan en pruebas modificadas de las reacciones bioquímicas convencionales mediante sustratos cromogénicos o

fluorescentes. Algunos de los más utilizados son Vitek2® (bioMérieux Vitek Inc., Hazelwood, MO) y Phoenix® (Becton Dickinson)^{36, 81}.

Tabla 4. Características bioquímicas de las especies de *Proteus*.

Las reacciones clave para la diferenciación de las cinco especies se muestran en negrita.

^a Incluye las cepas de los biogrupos 2 y 3. Adaptado de O'Hara C⁵⁹.

Prueba	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. myxofaciens</i>	<i>P. penneri</i>	<i>P. vulgaris</i> ^a	<i>P. hauseri</i>
Producción de indol	2	0	0	98	100
Rojo de metilo	97	100	100	85	100
Voges-Proskauer	50	100	0	0	0
Citrato de Simmons	65	100	0	15	0
Movilidad	95	100	85	95	100
Gelatina (22 °C)	90	100	50	91	100
Producción de SH ₂ (TSI)	98	0	30	95	50
Crecimiento en KCN	98	100	99	99	100
Fenilalanina desaminasa	98	100	99	99	100
Urea (Christensen)	98	100	99	95	100
Reducción de NO ₃ a NO ₂	95	100	80	95	100
Tartrato de Jordans	87	100	89	87	0
Utilización de acetato	20	0	12	20	0
Lipasa (aceite de maíz)	92	100	35	92	0
DNasa (25 °C)	50	0	12	50	0
Utilización de malonato	2	0	0	0	0
Lisina descarboxilasa	0	0	0	0	0
Arginina dihidrolasa	0	0	0	0	0
Ornitina descarboxilasa	99	0	0	0	0
D-Glucosa					
Producción de ácido	100	100	100	100	100
Producción de gas:	96	100	45	85	0
Ácido de:					
Adonitol	0	0	0	0	0
L-arabinosa	0	0	0	0	0
Celobiosa	1	0	0	1	0
Dulcitol	0	0	0	0	0
D-arabitol	0	0	0	0	0
Eritritol	0	0	0	0	0
Glicerol	70	100	40	70	0
Mio-inositol	0	0	0	0	0
Lactosa	2	0	1	2	0
Maltosa	0	100	96	0	100
D-manitol	0	0	0	0	0
D-manosa	0	0	0	0	0
Melibiosa	0	0	0	0	0
α-metil-D-glucósido	0	100	80	0	50
Rafinosa	1	0	9	1	0
L-ramnosa	1	0	0	1	0
Salicina	0	0	0	50	0
D-sorbitol	0	0	0	0	0
Sacarosa	15	100	100	97	100
Trehalosa	98	100	62	98	0
D-xilosa	98	0	100	98	0
Hidrólisis de la esculina	0	0	0	0	0
ONPG	0	0	10	0	0

La tecnología más actual para la identificación de microorganismos es la espectrometría de masas MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) que se utiliza para identificar los diferentes elementos químicos que forman un compuesto. Permite el análisis de biomoléculas

(biopolímeros como las proteínas, los péptidos y los azúcares) y moléculas orgánicas grandes (como los polímeros, los dendrímeros y otras macromoléculas). La técnica se basa en la espectrometría de masas y consiste en la ionización química de los compuestos para generar moléculas cargadas y la determinación de la relación masa / carga. Entre sus ventajas más importantes se destacan la rapidez y precisión en la obtención de resultados, la simplificación del proceso y una buena relación costo-beneficio cuando el flujo de trabajo es grande. Esta técnica permite obtener resultados de identificación en 100 segundos mediante un proceso sencillo que habitualmente no requiere la preparación de las muestras y con una gran seguridad^{5, 37}.

Métodos moleculares de identificación

Debido a la relevancia de las infecciones por *Proteus* en el ámbito hospitalario, se han desarrollado técnicas moleculares para el estudio epidemiológico de las mismas. Estas técnicas son utilizadas en casos de brotes, para el estudio de la diseminación clonal y para la caracterización de poblaciones bacterianas involucradas. Entre los marcadores moleculares que analizan el polimorfismo de fragmentos de restricción para determinar la clonalidad se destacan la ribotipificación y la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE). Si bien estos métodos son laboriosos, caros y lentos, la PFGE sigue siendo el método de referencia. Otros métodos que utilizan PCR, tales como RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) y más recientemente

ISSR (*intergenic single sequence repeats*): BOX-PCR y ERIC-PCR, brindan resultados más rápidos y comparables entre ellos, por lo cual son herramientas importantes de diagnóstico⁵⁵.

Otros sistemas de tipificación incluyen fagos, bacteriocinas, perfiles proteicos y serológicos. Ninguno de ellos se usa rutinariamente en los laboratorios clínicos y su utilidad está centrada en estudios epidemiológicos en centros de investigación o de referencia.

Las cepas de *Proteus* pueden mantenerse en agar tripteína de soja a 4°C con repiques mensuales o preservarse indefinidamente por liofilización. J.J. Farmer y F.W. Hickman (comunicación personal) sostienen que los cultivos en tubos de agar base para agar sangre o tripticasa soja sellados con un tapón de corcho o goma permanecen viables a temperatura ambiente por muchos años sin hacer repiques⁶⁴.

Sensibilidad a los antibióticos

Las cepas salvajes de *P. mirabilis* son más sensibles a los antimicrobianos que las de *P. vulgaris*, *P. penneri* y *P. hauseri*. Los integrantes del género *Proteus* son resistentes a la colistina y a las tetraciclinas. La resistencia a colistina está relacionada con la presencia de un LPS característico con gran cantidad de grupos 4-amino-L-arabinosa que reducen su afinidad por los antibióticos polipeptídicos. Esto impide el desplazamiento de los iones Ca^{+2} y Mg^{+2} del LPS, la desorganización de las membranas externas e internas de la pared de la bacteria y la muerte celular^{9, 59}. Con respecto a la

resistencia a tetraciclinas se han caracterizado diversos sistemas de eflujo. Uno de ellos está regulado por el gen cromosómico *TetJ* que generalmente es inducible si bien ocasionalmente se ha descrito una expresión constitutiva. El sistema de transporte AcrAB también se asocia a la resistencia intrínseca de algunas especies del género *Proteus* a las tetraciclinas y a la pérdida de sensibilidad frente a las glicilciclinas (tigeciclina)⁸.

La penicilina, los glucopéptidos, los macrólidos y las lincosamidas son inactivos frente a bacilos gram negativos y no deberían ser ensayados para estas bacterias. Las bacterias del género *Proteus* son sensibles a aminoglucósidos, quinolonas fluoradas y trimetoprima/sulfametoxazol. De manera característica y debido a una baja permeabilidad asociada a su dotación particular de porinas, se pierde sensibilidad a los carbapenemes, esencialmente al imipenem, que se traduce en una ligera elevación de los valores de CIM con rangos de 4 a 8 mg/l. Esta relativa falta de sensibilidad no ha causado mayores problemas clínicos, sin embargo se han comunicado fallas de tratamiento para erradicar *P. mirabilis* de infecciones de partes blandas y se constató una colonización postratamiento por esta bacteria⁹².

P. mirabilis no sintetiza de manera natural β -lactamasas cromosómicas (AmpC o similares) por lo que el fenotipo salvaje habitual es sensible a todos los antibióticos β -lactámicos exceptuando la penicilina y las isoxazolilpenicilinas.

Los fenotipos salvajes de *P. vulgaris* y *P. penneri* son iguales. Se caracterizan por la resistencia a las aminopenicilinas y a las cefalosporinas de primera y segunda generación. Es característica su resistencia a la cefuroxima, aunque alrededor del 30 % de los aislados puede ser sensible. Este perfil es

debido esencialmente a la producción de una β -lactamasa denominada CumA en *P. vulgaris* y HugA en *P. penneri*. Por la resistencia que confieren a la cefuroxima es frecuente referirse a ellas como cefuroximasas. Presentan sensibilidad reducida a acilureido y carboxipenicilinas y son sensibles a la asociación de amoxicilina y ácido clavulánico, a las cefamicinas (cefexitina) y a las cefalosporinas de amplio espectro incluyendo cefepima y al aztreonam. El perfil de resistencia a los antibióticos β -lactámicos en *P. penneri* y *P. vulgaris* es tan característico que puede utilizarse como control de la identificación⁸. *P. penneri* es resistente al cloranfenicol, aunque pueden existir discrepancias en los resultados de sensibilidad según el método utilizado para su estudio. La sensibilidad antibiótica de *P. myxofaciens* es desconocida, pero comparte con las otras especies la resistencia intrínseca a las polimixinas. Por último, los microorganismos integrantes del género *Proteus* deben ser considerados resistentes a la nitrofurantoína con independencia del valor de la CIM obtenido en las pruebas de sensibilidad. La producción de ureasa por estos microorganismos provoca la alcalinización de la orina y a pH alcalino la nitrofurantoína pierde actividad antibacteriana⁸.

Resistencia adquirida a los antibióticos

P. mirabilis tiene la capacidad de adquirir resistencia a los β -lactámicos por medio de enzimas que incluyen β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA), de espectro extendido (BLEE) y enzimas de tipo AmpC plasmídicas.

La resistencia a amoxicilina en *P. mirabilis* es principalmente debida a enzimas TEM-1 y TEM-2. También se han descrito enzimas resistentes a los inhibidores tales como TEM-44, TEM-65, TEM-73 y TEM-74.

Las cepas productoras de BLEE se han extendido en numerosas áreas geográficas: Las enzimas tipo TEM predominan en los EE.UU. y Europa. En la Argentina la CTX-M2 ocupa el primer lugar. En la actualidad se describieron nuevas enzimas como CTX-M15⁷⁸. Las enzimas VEB y PER son mucho menos frecuentes⁷⁴.

La prevalencia de cepas que adquieren enzimas tipo AmpC de origen plasmídico está aumentando y la más frecuente hasta el momento es la derivada del grupo CMY/LAT⁴.

En *P. penneri* y *P. vulgaris*, debido a mutaciones en los genes reguladores, se ha descrito la desrepresión de las β -lactamasas HugA y CumA, respectivamente, lo cual les confiere resistencia a la cefotaxima y a la ceftriaxona pero no a la ceftazidima, cefepima y al aztreonam, aunque se produce una ligera pérdida de sensibilidad. Este perfil es muy similar al que confieren las BLEE de tipo CTX-M. Cuando se realiza la clásica prueba de doble difusión con discos para la detección de BLEE, esta superposición de perfiles de resistencia hace a ambos fenotipos indistinguibles. La resistencia a la cefotaxima o ceftriaxona revierte con el agregado de ácido clavulánico, sulbactama o tazobactama. La frecuencia de cepas de *P. penneri* con desrepresión es baja, por lo que ante un aislamiento con sensibilidad disminuida a la cefotaxima, se debe excluir la presencia de BLEE. La imposibilidad de diferenciarlas por el fenotipo de resistencia obliga a realizar su confirmación por isoelectroenfoque o por métodos genéticos^{8, 74}(Tabla 5).

Tabla 5. Perfiles de sensibilidad y resistencia a los antibióticos β -lactámicos de *P. mirabilis*, *P. vulgaris* y *P. penneri*

Especie	Mecanismo de resistencia	Antimicrobianos								
		AMX	AMC	CFZ	CXM	FOX	CTX	CAZ	FEP	IMI
<i>P. mirabilis</i>	Fenotipo salvaje	S	S	S	S	S	S	S	S	s
	Penicilinasa (TEM-1)	R	S	S	S	S	S	S	S	s
	Peniclinasa (hiperprod. TEM-1)	R	r/R	I/R	S	S	S	S	S	s
	Penicilinasa (IRT)	R	R	S	S	S	S	S	S	s
	BLEE	R	S/I	R	r/R	S	r/R	r/R	r/R	s
<i>P. vulgaris</i> y <i>P. penneri</i>	CumA/HugA	R	S/I	R	R	S	S	S	S	S
	CumA/HugA+penicilinasa	R	S/I/r	R	R	S	S	S	S	S
	CumA/HugA desreprimido	R	I/R	R	R	S	r/R	S	s	S
	CumA/HugA + BLEE	R	I/R	R	R	S	R	r/R	r/R	S

S: sensible; I: intermedio; R: resistente; r: resistencia de bajo nivel; s: sensibilidad disminuida. AMX: amoxicilina (o ampicilina); AMC: amoxicilina/ácido clavulánico; CFZ: cefazolina; CXM: cefuroxima; FOX: cefoxitina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepima; IMP: imipenem. Adaptado de Cantón R.⁸.

Actualmente han emergido enzimas con actividad de carbapenemasas que hidrolizan un amplio espectro de β -lactámicos incluidos penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes y aztreonam. Se destacan las carbapenemasas pertenecientes a la clase A de Ambler cuyo mecanismo de hidrólisis involucra un sitio activo de serina en la posición 70. En este grupo las principales enzimas son KPC y GES^{53, 88}. El segundo grupo de carbapenemasas son las metalo β -lactamasas (MBL) en las cuales el mecanismo de hidrólisis es dependiente de la interacción del β -lactámico con un ion de Zn^{+2} en el sitio activo de la enzima. Entre las más frecuentes se destacan VIM, IMP y SPM. Han sido descritas cepas de *P. mirabilis* productoras de VIM-1^{58, 90, 91}.

Entre los mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas descritos hasta el momento, los más frecuentemente identificados en cepas clínicas son la

modificación del sitio blanco y las bombas de eflujo. En el primer caso ocurre una combinación de dos o más mutaciones en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) de los genes que codifican a la ADN girasa (genes *gyrA* y *gyrB*) y a la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*). Se debe principalmente a mutaciones de aminoácidos en las posiciones Ser-83 en *gyrA*, Ser-464 en *gyrB* y Ser-80 en *ParC*. En el segundo caso la sobreexpresión de bombas de eflujo contribuiría a la resistencia a las fluoroquinolonas. Saito et al. sugirieron que la superproducción de la bomba de eflujo AcrAB podría jugar un rol en la resistencia a estas drogas en aislamientos clínicos de *P. mirabilis* y que la combinación de ambos mecanismos en forma sinérgica podrían contribuir a la adquisición de un nivel más alto de resistencia⁷⁷. Algunas cepas presentan una sobreexpresión constitutiva de diferentes sistemas de eflujo cuyo sustrato es entre otros la tigeciclina. Un ejemplo es AcrAB en *P. mirabilis* y *M. morganii*³⁹.

La resistencia a los aminoglucósidos en el género *Proteus* es debida mayoritariamente a enzimas modificadoras de estos antibióticos⁸.

Género *Morganella*

Aislada por Morgan en 1906, *Morganella morganii* originalmente fue incluida en el género *Proteus* como *Proteus morganii*. En 1978 Brenner et al. demostraron que *P. morganii* tenía menos del 20 % de homología con *Proteus* spp. y *Providencia* spp. por lo que la relocalizaron en un nuevo género, *Morganella*. Jensen et al. en 1992 subdividieron a *M. morganii* en dos

subespecies, *M. morganii* subsp. *morganii* y *M. morganii* subsp. *sibonii* en base a su capacidad de fermentar la trehalosa y los resultados de estudios de hibridación ADN-ADN⁵². En el año 2006 fue propuesta una nueva especie, *M. psychrotolerans* sp. nov. Ésta parece ser importante en la formación de histamina a temperaturas de 0 a 5°C y se ha asociado a intoxicación alimentaria por la ingesta de pescado^{15, 17}. Existen pruebas bioquímicas que permiten diferenciarla de *M. morganii* (Tabla 6).

M. morganii subsp. *morganii* presenta 4 biogrupos (A, B, C y D) cuya separación está basada en las reacciones de descarboxilación de lisina y ornitina. *M. morganii* subsp. *sibonii* contiene a su vez 3 biogrupos (E, F y G) basados en las reacciones de descarboxilación de lisina y ornitina, producción de indol y crecimiento en presencia de KCN^{1, 32, 34} (Tabla 7).

Tabla 6. Diferenciación bioquímica de las especies de *Morganella*

Característica	<i>M. psychrotolerans</i>	<i>M. morganii</i>
Crecimiento a 2°C	+	-
Crecimiento a 37°C	-	+
Crecimiento en NaCl 8,5%	-	+
Trehalosa (48 h)	-	V
Galactosa (48 h)	-	+

Adaptado de Jette Emborg. Department of Seafood Research (FF). Danish Institute for Fisheries Research (DIFRES)

El esquema antigénico de *Morganella* permite diferenciar 77 serotipos con 44 antígenos somáticos (O), 4 capsulares (K) y 38 flagelares (H). En el año 1990 se agregaron 11 tipos O adicionales extendiendo el número de antígenos somáticos a 55³¹.

Tabla 7. Diferenciación de subespecies y biogrupos de *Morganella morganii*^a

	<i>M. morganii</i> subsp. <i>morganii</i> biogrupo				<i>M. morganii</i> subsp. <i>sibonii</i> biogrupo		
	A	B	C	D	E	F	G
Producción de indol	100	100	100	100	100	75	56
Rojo de metilo	100	95	100	100	100	75	89
Voges-Proskauer	0	0	0	0	0	0	0
Citrato de Simmons	0	0	0	0	0	0	0
SH ₂ (TSI)	0	15	25	0	0	0	22
Fenilalanina	100	96	100	100	100	100	100
Urea de Christensen	100	96	100	100	100	100	100
Movilidad	0	0	50	0	100	75	89
Gelatina (22 °C)	0	0	0	0	0	0	0
KCN	100	80	100	100	100	100	67
Lisina	0	100	0	100	100	75	0
Arginina	0	0	0	0	0	0	0
Ornitina	100	80	0	0	100	0	89
Malonato	0	5	0	0	0	0	0
Ácido de D-Glucosa	100	100	100	100	100	100	89
Gas de D-Glucosa	100	88	100	100	100	75	78
Adonitol	0	0	0	0	0	0	0
L-arabinosa	0	0	0	0	0	0	0
D-arabitol	0	0	0	0	0	0	0
Celobiosa	0	0	0	0	0	0	0
Dulcitol	0	0	0	0	0	0	0
Eritritol	0	0	0	0	0	0	0
Glicerol	50	100	50	100	0	0	0
Mio-inositol	0	0	0	0	0	0	0
Lactosa	0	0	0	0	0	0	0
Maltosa	0	0	0	0	0	0	0
D-manitol	0	0	0	0	0	0	0
D-manosa	100	92	100	100	100	100	89
Melibiosa	0	0	0	0	0	0	0
α-metil-D-glucósido	0	0	0	0	0	0	0
Rafinosa	0	0	0	0	0	0	0
L-ramnosa	0	0	0	0	0	0	0
Salicina	0	0	0	0	0	0	0
D-sorbitol	0	0	0	0	0	0	0
Sacarosa	0	0	0	0	0	0	11
Trehalosa	0	0	0	0	100	100	100
D-xilosa	0	0	0	0	0	0	0
Tartrato (Jordan)	50	96	100	100	100	100	100
Hidrólisis de esculina	0	0	0	0	0	0	0
Acetato	0	0	0	0	0	0	0
Lipasa	0	0	0	0	0	0	0
Nitratos a nitritos	100	84	100	33	100	100	100
ONPG	50	15	75	33	0	0	0

^a Los números corresponden a porcentajes de pruebas positivas a las 48 h. Las reacciones clave para la diferenciación de las cinco especies se muestran en negrita. Adaptado de O'Hara C⁵⁹. 9)

Habitat

M. morganii se encuentra en bajo número en las heces de humanos y animales sanos, incluyendo perros, ganado vacuno y pollos. También fue aislada de víboras, lobos marinos y focas⁵².

Está ampliamente distribuida en la naturaleza, en el suelo y aguas estancadas donde contribuye a la degradación de la materia orgánica gracias a su actividad proteolítica. No obstante su ubicuidad, es una causa poco común de infecciones adquiridas en la comunidad y es más frecuente encontrarla asociada a infecciones nosocomiales⁵⁹.

Aspectos patogénicos

Se conoce poco acerca de los factores de virulencia de esta bacteria. Entre los más importantes se destaca una hemolisina Hly con actividad intracelular similar a las hemolisinas de *E. coli* y *P. mirabilis*.

La actividad de la ureasa puede llevarse a cabo a pH tan bajo como 5,5 y tiene una gran afinidad por la urea lo que le permite hidrolizarla de 6 a 25 veces más rápido que *P. mirabilis*; no obstante aún se desconoce si éste es un factor importante en la patogénesis de la infección urinaria.

Produce hemaglutininas manosa sensibles (MSHA) y una enterotoxina lábil al calor⁵².

Significado clínico

M. morganii es un patógeno oportunista y si bien originalmente se lo asoció como agente causal de diarrea, su rol en ese contexto aún no está bien establecido.

Produce infecciones urinarias en menor medida que *P. mirabilis* debido en parte a su crecimiento más lento y a la naturaleza no inducible de su ureasa.

Este agente ha sido recuperado en forma ocasional en muy diversas infecciones, tales como meningitis, abscesos de cerebro, piomiositis, artritis, infecciones por mordedura de víbora, infecciones polimicrobianas asociadas a enfermedad hepatobiliar, a aneurisma de aorta abdominal, etc.^{20, 25, 46, 62, 95}.

En huéspedes inmunocomprometidos, principalmente diabéticos, están descritas infecciones de úlceras de miembros inferiores, fascitis necrotizante, bacteriemia y sepsis^{21, 48}.

Ha sido aislada de infecciones perinatales tales como corioamnionitis y endometritis posparto y en el neonato, bacteriemias de comienzo temprano y tardío, fascitis necrotizante, etc.^{35,45,69}.

Fue relacionada con brotes de infecciones asociadas al cuidado de la salud que incluyeron neumonías, meningitis posquirúrgicas e infecciones de heridas.

M. morganii puede producir una intoxicación por ingesta de pescado. Esta bacteria produce una enzima histidina descarboxilasa que reacciona con la histidina presente en el músculo de algunas especies de pescado incluido el atún, la sardina y la caballa entre otros. Cuando estos pescados son conservados en forma inapropiada puede ocurrir este fenómeno y clínicamente presentarse como un síndrome anafiláctico. El mismo fenómeno se le atribuye

a *M. psychrotolerans*, la cual estimula la producción de dicha enzima a temperaturas de 0 a 5°C¹⁶.

Identificación a nivel de género y especie

Morfología microscópica y características culturales

Son bacilos gram negativos rectos de 0,6-0,7 por 1-1,7 µm, móviles por flagelos peritricos y anaerobios facultativos. Las pruebas de desaminación oxidativa de L-fenilalanina y L-triptófano, ureasa, indol y ornitina descarboxilasa son positivas para este género. Fermentan relativamente pocos hidratos de carbono produciendo ácido de D-manosa pero no de D-xilosa.

Cuando desarrolla en agar nutritivo *M. morganii* produce colonias transparentes, lisas, de bordes enteros y no pigmentadas. En agar sangre de carnero las colonias por lo general no son hemolíticas, son pálidas, convexas y de 2 a 3 mm de diámetro luego de una incubación de toda la noche a 35-37 °C. Se puede observar hemólisis en agar sangre cuando la incubación es prolongada. Cuando desarrollan en un medio con el agregado de fenilalanina despiden un olor similar al de las almendras. La mitad de los aislados de *Morganella* cuando crecen en medios líquidos muestran una turbiedad uniforme con la formación de un anillo o película en la superficie.

Debido a que la mayoría de las cepas son lactosa y sacarosa negativas, en medios como agar MacConkey, XLD EMB y agar SS aparecen como colonias incoloras⁴².

Las cepas pueden mantenerse a temperatura ambiente sembradas en profundidad especialmente en agar movilidad por varios meses. Para un almacenamiento más prolongado se recomienda que los cultivos sean mantenidos a -70°C³¹.

Pruebas bioquímicas de identificación

Si bien el género es bioquímicamente homogéneo y las reacciones se asemejan bastante a las mostradas por los integrantes del género *Proteus*, la incapacidad de hidrolizar la gelatina por parte de *Morganella*, puede ser usada para su diferenciación³⁴.

Los pocos aislados de *M. psychrotolerans* sp. nov. que hasta el momento se conocen han mostrado que fermentan la glucosa con producción de gas y desaminan la fenilalanina. Son fermentadores de ribosa, D-fructuosa, D-manosa y xilitol. No fermentan glicerol, eritritol, arabinosa, xilosa, D-adonitol, L-sorbosa, L-ramnosa, dulcitol, inositol, D-manitol ni D-sorbitol. Existen pruebas que permiten diferenciar esta especie respecto de *M.morganii* (Tabla 6), las dos subespecies de esta última y los biogrupos de ambas (Tabla 7).

Respecto a la identificación por métodos automatizados y semiautomatizados, *M. morganii* está contenida en las bases de datos de los principales sistemas. La seguridad de identificación de los mismos es cercana al 100 %.

Sensibilidad a los antibióticos

M. morganii presenta resistencia natural a las polimixinas, nitrofuranos, macrólidos, lincosamidas, glucopéptidos, fosfomicina, ácido fusídico, sulfametoxazol y tetraciclinas. Al igual que lo que ocurre con *P. mirabilis*, las cepas de *M. morganii* presentan una sobreexpresión constitutiva de un sistema de eflujo AcrAB cuyo sustrato es la tigeciclina confiriéndoles una sensibilidad disminuida a esta droga⁹⁴. Es productora de una cefalosporinasa cromosómica inducible (AmpC) que le provee de una resistencia natural a bencilpenicilinas, oxacilina, aminopenicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación y es resistente a los inhibidores ácido clavulánico y sulbactama. No obstante el 60 % y el 50 % de los aislados son sensibles a cefoxitina y ampicilina-sulbactama respectivamente.

Las cepas salvajes son sensibles a aminoglucósidos, piperacilina, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, carbapenemes, aztreonam, quinolonas, cotrimoxazol y cloranfenicol. Con alguna excepción, no se encontraron diferencias significativas en la sensibilidad a los antibióticos entre los diferentes biogrupos. *M. morganii* subsp. *morganii* es más sensible a las tetraciclinas que las cepas de *M. morganii* subsp. *sibonii* pero no hay evidencia de que este parámetro pueda ser útil para diferenciarlas⁸⁶.

Las cepas de *M. psychrotolerans* son sensibles a cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina y ácido nalidíxico¹⁷.

Resistencia adquirida a los antibióticos

La enzima AmpC basal de *M. morganii* puede sufrir una desrepresión permanente o estar hiperproducida. En ambos casos extenderá su actividad a las oximinocefalosporinas sin afectar a cefepima, cefpiroma ni carbapenemes. La actividad sobre aztreonam es variable. Fue descrita la presencia de AmpC plasmídica y la producción de BLEE especialmente del grupo CTX-M^{67, 93}.

La resistencia a carbapenemes también fue observada en esta bacteria y puede deberse a una sobreexpresión de una AmpC cromosómica más la modificación de las porinas OmpC u OmpF. En estos casos la resistencia obedece a la combinación de ambos mecanismos y no a la presencia de carbapenemasas⁵⁸.

A nivel mundial fueron descritos aislados productores de carbapenemasas del grupo KPC y metalo β -lactamasas como VIM y NDM^{6, 51, 58, 66, 80, 91}.

Género *Providencia*

La primera especie del género conocido actualmente como *Providencia* fue descrita por Rettger en 1904. Esta bacteria fue inicialmente aislada en pollos y se la asoció a brotes infecciosos en estos animales. En 1918 Hadley y col. la caracterizaron y denominaron *Bacterium rettgeri*. Los microorganismos pertenecientes a este género sufrieron numerosas modificaciones taxonómicas desde la primera descripción, con superposiciones frecuentes entre las

bacterias estrechamente relacionadas de los géneros *Providencia*, *Proteus* y *Morganella*. En 1951 Kauffmann propuso el nombre de *Providencia* para denominar al género. En 1983 se caracterizaron por hibridación ADN-ADN las especies *Providencia stuartii*, *Providencia rettgeri*, *Providencia alcalifaciens* y *Providencia rustigianii*. En 1986 se describió la quinta especie, *Providencia heimbachae*.

Las especies *Providencia burhodogranariae*, *Providencia sneebia* y *Providencia vermicola* no son patógenas humanas; las dos primeras se encuentran en las moscas de la fruta y la última en nematodos infectantes de insectos^{38, 85}.

Como otras bacterias gram negativas, *Providencia* posee moléculas antigénicas que pueden servir como marcadores para la diferenciación de las cepas. Entre éstas, los antígenos O del LPS son los más usados para la serotipificación. El esquema original que incluyó a *P. alcalifaciens* y *P. stuartii* reconoció 56 antígenos (O), 28 antígenos flagelares (H) y dos antígenos capsulares (K)⁶⁵.

Habitat

Este microorganismo está ampliamente distribuido en la naturaleza y ha sido aislado de humanos y animales. Se encontró en el intestino de varios animales y en fuentes medioambientales contaminadas como aguas servidas.

Puede colonizar el tracto gastrointestinal humano que es un importante reservorio, especialmente de *P. stuartii* causante de infecciones nosocomiales.

Algunas especies como *P. heimbachae* y *P. rustigianii* se han aislado de pingüinos^{52, 65}.

Aspectos patogénicos

Los factores de virulencia que contribuyen a la patogenicidad de *Providencia* spp. incluyen la adherencia celular, la producción de fimbrias y la ureasa. La adherencia a las células uroepiteliales es debida a una adhesina manosa resistente denominada hemaglutinina MR/K (*mannose-resistant/Klebsiella-like*)^{12, 68}.

Se observó que las cepas productoras de ureasa fueron capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de *E. coli* sobre la superficie de catéteres y en orina, lo cual es una ventaja adaptativa importante^{19a}.

Significado clínico

Dentro del género *Providencia*, las especies que han sido claramente identificadas como patógenas son *P. stuartii*, *P. rettgeri* y *P. alcalifaciens*. En infecciones clínicas *P. stuartii* es el microorganismo más significativo y la virulencia de las otras dos especies es menos clara. Ha sido ampliamente reconocida como patógena en infecciones urinarias especialmente en pacientes con catéteres, probablemente estableciendo un nicho adecuado dentro de este dispositivo con lo cual aumenta su capacidad para producir bacteriuria. Esta bacteria no es particularmente invasora, sin embargo ciertos

factores como la cateterización prolongada y la cirugía urológica pueden aumentar la probabilidad de infección^{12, 68}.

Aunque *Proteus*, *Providencia* y *Morganella* se aíslan con mayor frecuencia en muestras de heces de pacientes con gastroenteritis que en individuos sin esta infección, su papel patogénico a este nivel es incierto. De entre todos los microorganismos relacionados, solo ha sido sugerida la implicación de *P. alcalifaciens* en cuadros de diarrea. En ensayos de cultivos celulares se demostró su capacidad para invadir las células, así como la de producir cuadros de diarrea en animales de experimentación^{33, 52, 59, 97}.

Como ocurre con los otros géneros de *Proteeae*, esta bacteria ha sido aislada de septicemias, meningitis, infecciones en pacientes quemados, infecciones abdominales, endocarditis, infecciones oculares, etc.^{43, 44, 82}.

Identificación a nivel de género y especie

Morfología microscópica y características culturales

Los miembros del género *Providencia* son bacilos gram negativos de 0,6-0,8 por 1,5-2,5 µm. Como todas las *Enterobacteriaceae*, son anaerobios facultativos, quimiorganótrofos y tienen metabolismo respiratorio y oxidativo. Son móviles por flagelos peritricos, sin embargo no exhiben el fenómeno de *swarming* típico del género *Proteus*. La producción de ureasa no es una característica constante del género, con la única excepción de *P. rettgeri*⁵².

Los medios utilizados en el laboratorio clínico para el aislamiento de enterobacterias pueden ser usados para el cultivo de *Providencia*. En agar

citrato desoxicolato las especies *P. alcalifaciens*, *P. rettgeri* y *P. stuartii* desarrollan colonias amarillas con un centro naranja. Este color es aparentemente causado por la precipitación de hidróxido férrico debido a la alcalinización que produce el crecimiento de la bacteria. En medios de agar que contienen rojo de fenol y tres azúcares (xilosa, manitol y galactosa) *P. alcalifaciens*, al no fermentar estos azúcares, produce colonias rojas. En un medio selectivo para *P. stuartii* que contiene colistina, inositol y como indicador el azul de bromotimol desarrolla colonias amarillas por la fermentación del inositol⁶⁵. Si bien la mayoría de las especies de *Providencia* son lactosa negativas, ocasionalmente esta bacteria es capaz de fermentar este azúcar. Cuando esto ocurre puede ser un marcador de gran ayuda para rastrear los orígenes y la diseminación de la infección en el ámbito hospitalario. (Leardini N, comunicación personal).

Pruebas bioquímicas de identificación

Los miembros de este género, al igual que *Proteus* y *Morganella*, producen ácido de D-manosa, son fenilalanina desaminasa positivos, lisina y ornitina descarboxilasas y arginina dihidrolasa negativos. La separación de las cinco especies puede realizarse por pruebas bioquímicas (Tabla 8).

Tabla 8. Características bioquímicas de las especies de *Providencia*^a

^aLos números corresponden a porcentajes de pruebas positivas a las 48 h. Las reacciones clave para la diferenciación de las cinco especies se muestran en negrita. Adaptado de O'Hara C⁵⁹.

Prueba	<i>P. alcalifaciens</i>	<i>P. heimbachae</i>	<i>P. rettgeri</i>	<i>P. rustigianii</i>	<i>P. stuartii</i>
Producción de indol	99	0	99	98	98
Rojo de metilo	99	85	93	65	100
Voges-Proskauer	0	0	0	0	0
Citrato de Simmons	98	0	95	15	93
SH ₂ (TSI)	0	0	0	0	0
Fenilalanina	98	100	98	100	95
Urea de Christensen	0	0	98	0	30
Movilidad	96	46	94	30	85
Gelatina (22 °C)	0	0	0	0	0
KCN	100	8	97	100	100
Lisina	0	0	0	0	0
Arginina	0	0	0	0	0
Ornitina	1	0	0	0	0
Malonato	0	0	0	0	0
Ácido de D-glucosa	100	100	100	100	100
Gas de D-glucosa	85	0	10	35	0
Adonitol	98	92	100	0	5
L-arabinosa	1	0	0	0	1
D-arabitol	0	92	100	0	0
Celobiosa	0	0	3	0	5
Dulcitol	0	0	0	0	0
Eritritol	0	0	75	0	0
Glicerol	15	0	60	5	50
Mio-inositol	1	46	90	0	95
Lactosa	0	0	5	0	2
Maltosa	1	54	2	0	1
D-manitol	2	0	100	0	10
D-manosa	100	100	100	100	100
Melibiosa	0	0	5	0	0
α-metil-D-glucosido	0	02	0	0	0
Rafinosa	1	0	5	0	7
L-ramnosa	0	100	70	0	0
Salicina	1	0	50	0	2
D-sorbitol	1	0	1	0	1
Sacarosa	15	0	15	35	50
Trehalosa	2	0	0	0	98
D-Xilosa	1	8	10	0	7
Tartrato (Jordan)	90	69	95	50	90
Hidrólisis de esculina	0	0	35	0	0
Utilización de acetato	40	0	60	25	75
Lipasa	0	0	0	0	0
DNasa (25 °C)	0	0	0	0	10
NO ₃ a NO ₂	100	100	100	100	100
ONPG	1	0	5	0	10

Métodos comerciales y moleculares

La seguridad en la identificación por los distintos métodos comerciales varía desde un 79 % para el sistema API 20E hasta el 100 % para VITEK GNI. Los estudios realizados con el sistema Crystal ID-E/NF informaron resultados de certeza del 83 al 100 %⁵⁹. Resultados similares se observaron con el sistema MicroScan Rapid Neg ID3⁸³.

Los métodos moleculares tales como el polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP) y la ribotipificación no son utilizados de rutina en la práctica clínica y se reservan para estudios epidemiológicos, en particular en infecciones asociadas al cuidado de la salud⁵².

Sensibilidad a los antibióticos

Las especies de *Providencia* presentan resistencia natural a polimixinas, tetraciclinas, nitrofuranos y, en particular *P. stuartii*, además es intrínsecamente resistente a sulfametoxazol. Esta última especie es la más resistente del género y una de las más resistentes de la familia *Enterobacteriaceae*⁸⁹.

Providencia produce una cefalosporinasa cromosómica, AmpC, que causa la resistencia natural a aminopenicilinas y cefalosporinas de primera generación. Tiene un comportamiento variable frente a cefoxitina y las cepas salvajes son sensibles a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, monobactams y carbapenems. Son resistentes a ampicilina-sulbactam aunque alrededor del 35 % de los aislados de *P. rettgeri* son sensibles y este

porcentaje es aún mayor para *P. stuartii*. *P. alcalifaciens* es la especie menos resistente del género ya que es sensible a cefalosporinas, aminoglucósidos y quinolonas⁸⁷.

P. stuartii presenta una enzima modificadora de aminoglucósidos de localización cromosómica, AAC(2'')-Ia, que le confiere resistencia a gentamicina, tobramicina, netilmicina y dibekacina. La mayoría de las cepas de *P. rettgeri* es sensible a los aminoglucósidos pero marcadamente resistente a las quinolonas. *P. heimbachae* se asemeja a *P. alcalifaciens* en sus perfiles de sensibilidad a cefalosporinas y aminoglucósidos⁶⁵.

Resistencia adquirida a los antibióticos

La creciente resistencia a los antimicrobianos, particularmente el aumento en la prevalencia de cepas productoras de BLEE, representan un problema emergente.

Además de la desrepresión y la hiperproducción de la enzima AmpC, estas bacterias suelen ser productoras de β -lactamasas de espectro extendido como CTX-M y PER-1. En la actualidad han surgido cepas productoras de carbapenemasas del tipo KPC y de metalo β -lactamasas IMP-1, VIM-1 y VIM-2, entre otras, que le confieren resistencia a los carbapenemes⁴⁷.

La resistencia acompañante a aminoglucósidos y fluoroquinolonas suele ser una característica de estas bacterias multirresistentes. Dos mecanismos enzimáticos identificados en *P. stuartii* incluyen una acetilaminotransferasa hidrolizante de aminoglucósidos y una eritromicina esterasa involucrada en la

resistencia a macrólidos⁴⁷. Los nuevos mecanismos de resistencia plasmídicos a fluoroquinolonas también han sido descritos en el género *Providencia*²³.

Bibliografía

1. Abbott SL. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas* and other *Enterobacteriaceae*. En: C. K. Versalovic J, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 10th edition. Washington DC, ASM Press, 2011, p. 639-57.
2. Anandi C, Alaguraja D, Natarajan V, Ramanathan M, Subramaniam CS, Thulasiram M, Sumithra S. Bacteriology of diabetic foot lesions. *Indian J Med Microbiol*. 2004; 22:175-8.
3. Andreu A, Alós JI, Gobernado M, Marco F, de la Rosa M, García-Rodríguez JA. Etiology and antimicrobial susceptibility among uropathogens causing community-acquired lower urinary tract infections: a nationwide surveillance study. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005; 23:4-9.
4. Aragón LM, Mirelis B, Miró E, Mata C, Gómez L, Rivera A, Coll P, Navarro F. Increase in beta-lactam-resistant *Proteus mirabilis* strains due to CTX-M- and CMY-type as well as new VEB- and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 61:1029-32.
5. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*. 2010; 48:1549-54.
6. Bogaerts P, Bouchahrouf W, de Castro RR, Deplano A, Berhin C, Pierard D, Denis O, Glupczynski Y. Emergence of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Belgium. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55:3036-8.
7. Budding AE, Ingham CJ, Bitter W, Vandenbroucke-Grauls CM, Schneeberger PM. The Dienes phenomenon: competition and territoriality in swarming *Proteus mirabilis*. *J Bacteriol*. 2009; 191:3892-900.

8. Cantón R, Sánchez-Moreno MP, Morosini Reilly MI. *Proteus penneri*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006; 24 Suppl 1:8-13.
9. Castro ST, Rodríguez CR, Perazzi BE, Radice M, Paz Sticott M, Muzio H, Juárez J, Gutkind G, Famiglietti AM, Santini PI, Vay CA. Comparison of different methods in order to identify *Proteus* spp. Rev Argent Microbiol. 2006; 38:119-24.
10. Citron DM, Goldstein EJ, Merriam CV, Lipsky BA, Abramson MA. Bacteriology of moderate-to-severe diabetic foot infections and in vitro activity of antimicrobial agents. J Clin Microbiol. 2007; 45:2819-28.
11. Córdoba A, Monterrubio J, Bueno I, Corcho G. Severe community-acquired pneumonia due to *Proteus mirabilis*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2005; 23:249-50.
12. Darouiche RO. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. Clin Infect Dis. 2001; 33:1567-72.
13. Donnenberg MS. *Enterobacteriaceae*. En: Mandell GL, Bennett JE. editors. Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th ed. Philadelphia PA, EE.UU.Churchill Livingstone,2010, p. 2815-34.
14. Ebringer A, Rashid T. Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease triggered by *Proteus* urinary tract infection. Clin Dev Immunol. 2006; 13:41-8.
15. Emborg J, Dalgaard P. Formation of histamine and biogenic amines in cold-smoked tuna: an investigation of psychrotolerant bacteria from samples implicated in cases of histamine fish poisoning. J Food Prot. 2006; 69:897-906.
16. Emborg J, Dalgaard P. Growth, inactivation and histamine formation of *Morganella psychrotolerans* and *Morganella morganii* - development and evaluation of predictive models. Int J Food Microbiol. 2008; 128:234-43.
17. Emborg J, Dalgaard P, Ahrens P. *Morganella psychrotolerans* sp. nov., a histamine-producing bacterium isolated from various seafoods. Int J Syst Evol Microbiol. 2006; 56:2473-9.
18. Euzeby JP. *Proteus*. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire (on line).Octubre 2000.<http://www.bacdico.net>.
19. Flannery EL, Mody L, Mobley HL. Identification of a modular pathogenicity island that is widespread among urease-producing uropathogens and shares features with a diverse group of mobileelements. Infect Immun. 2009; 77:4887-94.

- 19a. Fletcher M, Oppenheimer SR, Warren JW. Colonization of urinary catheters by *Escherichia coli* and *Providencia stuartii* in a laboratory model system. *J Urol*. 1994;152:232-6
20. Gautam V, Gupta V, Joshi RM, Sawhney G, Duhan S. *Morganella morganii*-associated arthritis in a diabetic patient. *J Clin Microbiol*. 2003; 41:3451.
21. Ghosh S, Bal AM, Malik I, Collier A. Fatal *Morganella morganii* bacteraemia in a diabetic patient with gas gangrene. *J Med Microbiol*. 2009; 58:965-7.
22. Giammanco GM, Grimont PA, Grimont F, Lefevre M, Giammanco G, Pignato S. Phylogenetic analysis of the genera *Proteus*, *Morganella* and *Providencia* by comparison of *rpoB* gene sequences of type and clinical strains suggests the reclassification of *Proteus myxofaciens* in a new genus, *Cosenzaea* gen. nov., as *Cosenzaea myxofaciens* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2011; 61:1638-44.
23. Guillard T, Cambau E, Neuwirth C, Nenninger T, Mbadi A, Brasme L, Vernet-Garnier V, Bajolet O, de Champs C. Description of a 2,683-base-pair plasmid containing *qnrD* in two *Providencia rettgeri* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56:565-8.
24. Gül HC, Kurnaz A, Turhan V, Oncül O, Pahsa A. Microorganisms isolated from middle ear cultures and their antibacterial susceptibility in patients with chronic suppurative otitis media. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg*. 2006;16:164-8.
25. Hakyemez IN, Sit M, Aktas G, Tas T, Mengeloglu FZ, Kucukbayrak A. A case of giant hepatic hydatid cyst infected with *Morganella morganii* and the literature review. *Case Rep Gastrointest Med*. 2012:591561.
26. Hernández JB. Biofilm: latent threat or protective factor? state of art. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007; 27:22-8.
27. Hickman FW, Steigerwalt AG, Farmer JJ 3rd, Brenner DJ. Identification of *Proteus penneri* sp. nov., formerly known as *Proteus vulgaris* indole negative or as *Proteus vulgaris* biogroup 1. *J Clin Microbiol*. 1982; 15:1097-102.
28. Hola V, Peroutkova T, Ruzicka F. Virulence factors in *Proteus* bacteria from biofilm communities of catheter-associated urinary tract infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012; 65:343-9.

29. Jacobsen SM, Lane MC, Harro JM, Shirtliff ME, Mobley HL. The high-affinity phosphate transporter Pst is a virulence factor for *Proteus mirabilis* during complicated urinary tract infection. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008; 52:180-93.
30. Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HL, Shirtliff ME. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. Clin Microbiol Rev. 2008; 21:26-59.
31. Janda JM, Abbott SL. Genus XXI *Morganella*. En: Garrity G, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JR. editors. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2: The Proteobacteria. Part B: The Gammaproteobacteria. 2nd ed. Michigan, USA, Springer US, 2005, p. 707-10
32. Janda JM, Abbott SL, Khashe S, Robin T. Biochemical investigations of biogroups and subspecies of *Morganella morganii*. J Clin Microbiol. 1996; 34:108-13.
33. Janda JM, Abbott SL, Woodward D, Khashe S. Invasion of HEp-2 and other eukaryotic cell lines by *Providenciae*: further evidence supporting the role of *Providencia alcalifaciens* in bacterial gastroenteritis. Curr Microbiol. 1998; 37:159-65.
34. Jensen KT, Frederiksen W, Hickman-Brenner FW, Steigerwalt AG, Riddle CF, Brenner DJ. Recognition of *Morganella* subspecies, with proposal of *Morganella morganii* subsp. *morganii* subsp. nov. and *Morganella morganii* subsp. *sibonii* subsp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1992; 42:613-20.
35. Johnson JR, Feingold M. Case of chorioamnionitis in an immunocompetent woman caused by *Morganella morganii*. J Matern Fetal Med. 1998; 7:13-4.
36. Jordá Vargas L, Vila A, Lanza A, Bonvehí P, Nazar J, Mikietuk A, Labat R, Smayevsky J. Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana. Acta Bioq Clín Latinoam. 2005; 39:19-25.
37. Jordana-Lluch E, Martro Catalá E, Ausina Ruíz V. Mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012; 30:635-44.
38. Juneja P, Lazzaro BP. *Providencia sneebia* sp. nov. and *Providencia burhodogranariea* sp. nov., isolated from wild *Drosophila melanogaster*. Int J Syst Evol Microbiol. 2009; 59:1108-11.

39. Keeney D, Ruzin A, McAleese F, Murphy E, Bradford PA. MarA-mediated overexpression of the AcrAB efflux pump results in decreased susceptibility to tigecycline in *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother. 2008; 61:46-53.
40. Kishore J. Isolation, identification and characterization of *Proteus penneri* - a missed rare pathogen. Indian J Med Res. 2012; 135:341-5.
41. Koneman EW, Stephen A, Janda W, Schreckenberger PC, Winn (h) WC. *Enterobacteriaceae*. EnKoneman EW, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn (h) WC. editors. Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas Color 5ª ed. Buenos Aires, Argentina, Editorial Médica Panamericana S.A., 2004, p. 171-247.
42. Koneman EW, Winn (h) WC, Washington C. The *Enterobacteriaceae*. En: Koneman EW, Stephen A, Janda W, Schreckenberger PC, Winn (h) WC, Procop G, Woods G. editors. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed.. Philadelphia PA, Lippincott, Williams and Wilkins, 2006, p. 211-302.
43. Koreishi AF, Schechter BA, Karp CL. Ocular infections caused by *Providencia rettgeri*. Ophthalmol. 2006; 113:1463-6.
44. Krake PR, Tandon N. Infective endocarditis due to *Providencia stuartii*. South Med J. 2004; 97:1022-3.
45. Krebs VL, Koga KM, Diniz EM, Ceccon ME, Vaz FA. Necrotizing fasciitis in a newborn infant: a case report. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo. 2001; 56:59-62.
46. Kwon OY, Lee JS, Choi HS, Hong HP, Ko YG. Infected abdominal aortic aneurysm due to *Morganella morganii*: CT findings. Abdom Imaging. 2011; 36:83-5.
47. Lee HW, Kang HY, Shin KS, Kim J. Multidrug-resistant *Providencia* isolates carrying blaPER-1, blaVIM-2, and armA. J Microbiol. 2007; 45:272-4.
48. Lee IK, Liu JW. Clinical characteristics and risk factors for mortality in *Morganella morganii* bacteremia. J Microbiol Immunol Infect. 2006; 39:328-34.
49. Li X, Lockett CV, Johnson DE, Lane MC, Warren JW, Mobley HL. Development of an intranasal vaccine to prevent urinary tract infection by *Proteus mirabilis*. Infect Immun. 2004; 72:66-75.
50. Li X, Mobley HL. Vaccines for *Proteus mirabilis* in urinary tract infection. Int J Antimicrob Agents. 2002; 19:461-5.

51. Mahrouki S, Belhadj O, Chihi H, Mohamed BM, Celenza G, Amicosante G, Perilli M. Chromosomal blaCTX-M-(1)(5) associated with ISEcp1 in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* isolated at the Military Hospital of Tunis, Tunisia. J Med Microbiol. 2012; 61:1286-9.
52. Manos J, Belas R. The Genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. En:Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K, Stackebrandt E, editors. The Prokaryotes, Vol 6, 3rd edition. Singapore, Springer Science+Business Media, LLC, 2006, p. 245-69.
53. Marschall J, Tibbetts RJ, Dunne WM, Jr, Frye JG, Fraser VJ, Warren DK. Presence of the KPC carbapenemase gene in *Enterobacteriaceae* causing bacteremia and its correlation with in vitro carbapenem susceptibility. J Clin Microbiol. 2009; 47:239-41.
54. Matsuyama T, Takagi Y, Nakagawa Y, Itoh H, Wakita J, Matsushita M. Dynamic aspects of the structured cell population in a swarming colony of *Proteus mirabilis*. J Bacteriol. 2000; 182:385-93.
55. Michelim L, Muller G, Zacaria J, Delamare AP, Costa SO, Echeverrigaray S. Comparison of PCR-based molecular markers for the characterization of *Proteus mirabilis* clinical isolates. Braz J Infect Dis. 2008; 12:423-9.
56. Mobley HL, Belas R. Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. Trends Microbiol. 1995; 3:280-4.
57. Morris PS, Leach AJ. Acute and chronic otitis media. Pediatr Clin North Am. 2009; 56:1383-99.
58. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! Trends Mol Med. 2012; 18:263-72.
59. O'Hara CM, Brenner FW, Miller JM. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. Clin Microbiol Rev. 2000; 13:534-46.
60. O'Hara CM, Brenner FW, Steigerwalt AG, Hill BC, Holmes B, Grimont PA, Hawkey PM, Penner JL, Miller JM, Brenner DJ. Classification of *Proteus vulgaris* biogroup 3 with recognition of *Proteus hauseri* sp. nov., nom. rev. and unnamed *Proteus* genomospecies 4, 5 and 6. Int J Syst Evol Microbiol. 2000; 50 Pt 5:1869-75.
61. Parvez N, Dutta P, Ray P, Shah VN, Prakash M, Khandelwal N, Kaman L, Bhansali A. Microbial profile and utility of soft tissue, pus, and bone cultures in diagnosing diabetic foot infections. Diabetes Technol Ther. 2012;14:669-74.

62. Patil AB, Nadagir SD, Lakshminarayana S, Syeda F M. *Morganella morganii*, subspecies *morganii*, biogroup A: An unusual causative pathogen of brain abscess. J Neurosci Rural Pract. 2012; 3:370-2.
63. Pellegrino R, Galvalisi U, Scavone P, Sosa V, Zunino P. Evaluation of *Proteus mirabilis* structural fimbrial proteins as antigens against urinary tract infections. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003; 36:103-10.
64. Penner JL Genus XI *Proteus* En: Garrity G, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JR. editors. Bergey's Manual of Systematic Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2: The Proteobacteria. Part B: The Gammaproteobacteria. 2nd ed.,Michigan, 2005, p. 745-52.
65. Penner JL. Genus XXX *Providencia*,. En: Garrity G, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JR editors. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2: The Proteobacteria. Part B: The Gammaproteobacteria. 2nd ed.Michigan, USA, Springer US, 2005, 753-9.
66. Poirel L, Lagrutta E, Taylor P, Pham J, Nordmann P. Emergence of metallo-beta-lactamase NDM-1-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* in Australia. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54:4914-6.
67. Radice M, Power P, Di Conza J, Gutkind G. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46:602-4.
68. Rahav G, Pinco E, Silbaq F, Bercovier H. Molecular epidemiology of catheter-associated bacteriuria in nursing home patients. J Clin Microbiol. 1994; 32:1031-4.
69. Ranu SS, Valencia GB, Piecuch S. Fatal early onset infection in an extremely low birth weight infant due to *Morganella morganii*. J Perinatol. 1999; 19:533-5.
70. Rashid T, Ebringer A. Rheumatoid arthritis in smokers could be linked to *Proteus* urinary tract infections. Med Hypotheses. 2008; 70:975-80.
71. Rashid T, Ebringer A. Rheumatoid arthritis is linked to *Proteus*--the evidence. Clin Rheumatol. 2007; 26:1036-43.
72. Rocha SP, Elias WP, Cianciarullo AM, Menezes MA, Nara JM, Piazza RM, Silva MR, Moreira CG, Pelayo JS. Aggregative adherence of uropathogenic *Proteus mirabilis* to cultured epithelial cells. FEMS Immunol Med Microbiol. 2007; 51:319-26.
73. Rocha SP, Pelayo JS, Elias WP. Fimbriae of uropathogenic *Proteus mirabilis*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2007; 51:1-7.

74. Rodríguez C, Radice M, Perazzi B, Castro S, Juárez J, Santini P, Vay C, Famiglietti A, Gutkind G. Enzymatic resistance to beta lactam antibiotics within the genus *Proteus* and evaluation of *Proteus mirabilis* phenotypes and genotypes for resistance to third- and fourth-generation cephalosporins. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005; 23:122-6.
75. Rozalski A, Kotelko K. Hemolytic activity and invasiveness in strains of *Proteus penneri*. *J Clin Microbiol*. 1987; 25:1094-6.
76. Rozalski A, Sidorczyk Z, Kotelko K. Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. *Microbiol Rev*. 1997; 61:65-89.
77. Saito R, Sato K, Kumita W, Inami N, Nishiyama H, Okamura N, Moriya K, Koike K. Role of type II topoisomerase mutations and AcrAB efflux pump in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Proteus mirabilis*. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 58:673-7.
78. Sennati S, Santella G, Di Conza J, Pallecchi L, Pino M, Ghiglione B, Rossolini GM, Radice M, Gutkind G. Changing epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in Argentina: emergence of CTX-M-15. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56:6003-5.
79. Sharma VK, Khadka PB, Joshi A., Sharma R. Common pathogens isolated in diabetic foot infection in Bir Hospital. *Kathmandu Univ Med J*. 2006; 4:295-301.
80. Shi DS, Wang WP, Kuai SG, Shao HF, Huang M. Identification of bla KPC-2 on different plasmids of three *Morganella morganii* isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31:797-803.
81. Silva Ojeda, F. Phoenix® versus Vitek2® en identificación bacteriana. *Rev Chil Infectol*. 2012; 29:118.
82. Sipahi OR, Bardak-Ozdemir S, Ozgiray E, Aydemir S, Yurtseven T, Yamazhan T, Tasbakan Ulusoy MS. Meningitis due to *Providencia stuartii*. *J Clin Microbiol*. 2010; 48:4667-8.
83. Snyder JW, Munier GK, Johnson CL. Direct comparison of the BD Phoenix system with the MicroScan WalkAway system for identification and antimicrobial susceptibility testing of *Enterobacteriaceae* and nonfermentative gram-negative organisms. *J Clin Microbiol*. 2008; 46:2327-33.
84. Sohn KM, Kang CI, Joo EJ, Ha YE, Chung DR, Peck KR, Lee NY, Song JH. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Proteus mirabilis* bacteremia. *Korean J Intern Med*. 2011; 26:89-93.

85. Somvanshi VS, Lang E, Straubler B, Sproer C, Schumann P, Ganguly S, Saxena AK, Stackebrandt E. *Providencia vermicola* sp. nov., isolated from infective juveniles of the entomopathogenic nematode *Steinernema thermophilum*. Int J Syst Evol Microbiol. 2006; 56:629-33.
86. Stock I, Wiedemann B. Identification and natural antibiotic susceptibility of *Morganella morganii*. Diagn Microbiol Infect Dis. 1998; 30:153-65.
87. Stock I, Wiedemann B. Natural antibiotic susceptibility of *Providencia stuartii*, *P. rettgeri*, *P. alcalifaciens* and *P. rustigianii* strains. J Med Microbiol. 1998; 47:629-42.
88. Tibbetts R, Frye JG, Marschall J, Warren D, Dunne W. Detection of KPC-2 in a clinical isolate of *Proteus mirabilis* and first reported description of carbapenemase resistance caused by a KPC beta-lactamase in *P. mirabilis*. J Clin Microbiol. 2008; 46:3080-3.
89. Tran QT, Mahendran KR, Hajjar E, Ceccarelli M, Davin-Regli A, Winterhalter M, Weingart H, Pages JM. Implication of porins in beta-lactam resistance of *Providencia stuartii*. J Biol Chem. 2010; 285:32273-81.
90. Tsakris A, Ikonomidis A, Poulou A, Spanakis N, Pournaras S, Markou F. Transmission in the community of clonal *Proteus mirabilis* carrying VIM-1 metallo-beta-lactamase. J Antimicrob Chemother. 2007; 60:136-9.
91. Tsakris A, Ikonomidis A, Spanakis N, Poulou A, Pournaras S. Characterization of In3Mor, a new integron carrying VIM-1 metallo-beta-lactamase and sat1 gene, from *Morganella morganii*. J Antimicrob Chemother. 2007; 59:739-41.
92. Villar HE, Danel F, Livermore DM. Permeability to carbapenems of *Proteus mirabilis* mutants selected for resistance to imipenem or other beta-lactams. J Antimicrob Chemother. 1997; 40:365-70.
93. Villegas MV, Kattan JN, Quinteros MG, Casellas JM. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in South America. Clin Microbiol Infect. 2008; 14 Suppl 1:154-8.
94. Vouillamoz J, Moreillon P, Giddey M, Entenza JM. In vitro activities of tigecycline combined with other antimicrobials against multiresistant gram-positive and gram-negative pathogens. J Antimicrob Chemother. 2008; 61:371-4.
95. Wang TJ, Huang JS, Hsueh PR. Acute postoperative *Morganella morganii* panophthalmitis. Eye (Lond). 2005; 19:713-5.

96. Weber G, Link F, Ferber E, Munder PG, Zeitter D, Bartlett RR, Nixdorff K. Differential modulation of the effects of lipopolysaccharide on macrophages by a major outer membrane protein of *Proteus mirabilis*. J Immunol. 1993; 151:415-24.
97. Yoh M, Matsuyama J, Ohnishi M, Takagi K, Miyagi H, Mori K, Park KS, Ono T, Honda T. Importance of *Providencia* species as a major cause of travellers' diarrhoea. J Med Microbiol. 2005; 54:1077-82.
98. Zablotni, A, Zych K, Kondakova AN, Siwinska M, Knirel YA, Sidorczyk Z. Serological and structural characterization of the O-antigens of the unclassified *Proteus mirabilis* strains TG 83, TG 319, and CCUG 10700 (OA). Arch Immunol Ther Exp. 2007; 55:347-52.
99. Zunino P, Sosa V, Allen AG, Preston A, Schlapp G, Maskell DJ. *Proteus mirabilis* fimbriae (PMF) are important for both bladder and kidney colonization in mice. Microbiology. 2003; 149:3231-7.
100. Zych K, Kolodziejska K, Drzewiecka D, Perepelov AV, Knirel YA, Sidorczyk Z. Serological classification and epitope specificity of *Proteus vulgaris* TG 251 from *Proteus* serogroup O65. Arch Immunol Ther Exp. 2007; 55:187-91.

Parte II.c.1

ENTEROBACTERIAS

Capítulo II.c.1.6

Género *Yersinia* y otras enterobacterias

FLAVIA ALEJANDRA AMALFA

Bioquímica de Planta del Hospital General de Agudos P. Piñero,
Sector Bacteriología

Bacterióloga de Guardia del Hospital de Pediatría
"Prof. Dr. Juan P. Garrahan"

HORACIO A. LOPARDO

Consultor Honorario del Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría
"Prof. Dr. Juan P. Garrahan"

Profesor Consulto de Microbiología Clínica. Facultad de Ciencias Exactas.
Universidad Nacional de La Plata

Miembro de la Comisión Directiva de SADEBAC,
Asociación Argentina de Microbiología

Género *Yersinia*

Aspectos taxonómicos

Son diecisiete las especies del género *Yersinia*, aunque solo tres son fehacientemente patógenas para el hombre y animales de sangre caliente: *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pseudotuberculosis*².

Yersinia intermediapodría ser también un agente etiológico de conuntivitis y diarrea. Otras especies podrían actuar como oportunistas: *Yersinia aldovae*, *Yersinia alecksiciae*⁸³, *Yersinia bercovieri*, *Yersinia frederiksenii*, *Yersinia kristensenii*, *Yersinia massiliensis*⁶², *Yersinia mollaretii*, *Yersinia rohdei*, *Yersinia ruckeri* y *Yersinia similis*.

Características culturales

Las especies de *Yersinia* son bacterias de crecimiento lento si las comparamos con el resto de las enterobacterias, pero pueden desarrollar en medios comunes. De hecho el agar SS puede ser una alternativa para la recuperación de yersinias enteropatógenas. Las pruebas bioquímicas son más confiables si se realizan entre los 25°C y los 32°C . Algunas especies pueden reproducirse a 4°C.

Importancia clínica e identificación a nivel de especie

Y. pestis es el agente etiológico de la peste bubónica y de la peste neumónica. *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* pueden causar gastroenteritis y linfadenitis mesentérica que puede confundirse con apendicitis. Estas bacterias pueden causar infecciones de heridas, artritis séptica, infecciones urinarias y bacteriemia. También pueden desencadenar complicaciones no infecciosas como artritis reactiva, eritema nodoso y glomerulonefritis. *Yersinia aldovae*, *Yersinia bercovieri*, *Yersinia frederiksenii*, *Yersinia intermedia*, *Yersinia kristensenii*, *Yersinia mollaretii*, y *Yersinia rohdei*, se consideraban previamente como biovariedades de *Y. enterocolitica* y, como ya se mencionó, pueden actuar como oportunistas. *Y. ruckeri* puede causar patología en salmónidos. Hay controversias respecto al valor clínico de estas yersinias similares a *Y. enterocolitica* que han sido aisladas de muestras humanas. Estas especies están ampliamente distribuidas en la naturaleza: animales, agua, suelo, alimentos.

Si bien las pruebas bioquímicas convencionales pueden resultar orientadoras (Tabla 1), es necesario apelar a métodos moleculares para su identificación definitiva.

La aglutinación en portaobjetos para las serovariedades patógenas sumada a la identificación de especies a partir de pruebas bioquímicas convencionales son los métodos más utilizados en la rutina de los laboratorios. La principal desventaja reside en la presencia de los antígenos O:3 y O:9 en cuatro especies “no patógenas” que pueden aislarse a partir de muestras humanas.

Tabla 1. Pruebas bioquímicas básicas para separar las especies patógenas de *Yersinia* entre sí y diferenciarlas de otras encontradas en materiales humanos.

Especie	Indol	Urea	Orn	Lac	Sac	Mal	Cel	Ram	Esc
<i>Y. pestis</i>	-	-	-	-	-	V	-	-	V
<i>Y. enterocolitica</i>	V	V	+	-	+	V	V	-	V
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	-	+	-	-	-	+	-	V	+
<i>Y. frederiksenii</i>	+	V	+	V	+	+	+	+	V
<i>Y. intermedia</i>	+	V	+	V	+	+	+	+	+
<i>Y. kristensenii</i>	V	V	+	-	-	+	+	-	-
<i>Y. rohdei</i>	-	V	V	-	+	-	V	-	-
<i>Y. aldovae</i>	-	V	V	-	V	-	-	-	-
<i>Y. bercovieri</i>	-	V	V	V	+	+	+	-	V
<i>Y. mollaretti</i>	-	V	V	V	+	V	+	-	-
<i>Y. ruckeri</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-

Rojo de metilo y manitol: positivos para todas las especies.

Voges Proskauer, citrato de Simmons, SH₂ del TSI, fenilalanina, lisina y gelatina (excepto *Y. ruckeri* = V), movilidad, malonato y DNasa: negativos para todas las especies.

Orn = ornitina, Lac = lactosa, Sac = sacarosa, Mal = maltosa, Cel = celobiosa, Ram= ramnosa, Esc = esculina

Factores de virulencia

Las yersinias enteropatógenas tienen tres adhesinas: la invasina, la YadA y la Ail. La invasina es la primera adhesina requerida para la invasión entérica. Se une a las integrinas $\beta(1)$ sobre las células ciliadas en el íleon distal y de este modo conduce a la fagocitosis y permite a la bacteria atravesar el epitelio intestinal. YadA es la adhesina principal. Es una proteína polifuncional que permite la adherencia a células del hospedador e incluso a componentes

de la matriz extracelular, confiere a la bacteria capacidad de autoaglutinación y permite su resistencia a la fagocitosis y a la actividad inhibitoria del suero. La adhesina Ail cumple un rol de menor importancia en estos mismos procesos.

Y. pestis no posee YadA ni invasina pero expresa otras adhesinas: adhesinas de autotransporte y antígeno pH6⁶¹.

Yersinia enterocolitica

Hábitat, aspectos epidemiológicos e importancia clínica

Y. enterocolitica puede causar la enfermedad conocida como yersiniosis en el hombre y en los animales. El cerdo parece ser la principal fuente de contagio para los seres humanos dada la relación genética cercana entre las cepas porcinas y las humanas. Ocasionalmente ha sido detectada en vegetales y en aguas. El perro y los roedores también han sido sospechados de transmitir la yersiniosis al hombre.

Los brotes de origen alimentario son raros y lo común son los casos esporádicos.

Y. enterocolitica puede causar síntomas gastrointestinales que van desde una enfermedad subclínica y diarrea leve y autolimitada hasta una linfadenitis mesentérica que puede simular una apendicitis por presentarse una signo-sintomatología de fosa ilíaca derecha¹⁴. Las manifestaciones clínicas dependen en parte de la edad y de las condiciones físicas e inmunológicas del paciente. El serotipo infectante también juega un rol en la gravedad de la infección. La

gastroenteritis, causada por *Y. enterocolitica* es la forma más frecuente de yersiniosis y principalmente afecta a niños pequeños. En un estudio de 9 años realizado en Noruega se observó que los síntomas predominantes eran diarrea, dolor abdominal, vómitos y pérdida de peso⁷⁸. En niños mayores y adultos jóvenes predomina el síndrome pseudoapendicular. El apéndice puede estar involucrado hasta en un 40% de los casos⁹².

En algunos casos, en adultos jóvenes, puede generar secuelas como artritis reactiva, eritema nodoso, uveítis, glomerulonefritis y miocarditis. La sepsis es una complicación muy rara pero puede darse en pacientes con enfermedades de base predisponentes o puede generarse a través de transfusiones^{13, 48}.

Los pacientes inmunocomprometidos, los diabéticos y los que sufren de hemosiderosis, cirrosis u otras enfermedades hepáticas son los más susceptibles a las infecciones diseminadas por *Y. enterocolitica*. Además de bacteriemias, que se dan especialmente en niños pequeños, se han descrito casos de abscesos hepáticos, encefalitis y artritis sépticas, incluso en adultos^{18, 55, 65, 74, 88}.

Y. enterocolitica puede generar úlceras intestinales que pueden llevar hasta a una verdadera perforación. Recientemente se publicó un caso de sangrado intestinal masivo en una mujer de 41 años a la que tuvo que realizarse una importante resección ileocecal⁵.

Yersinia enterocolitica es un patógeno zoonótico de gran importancia en ciertas zonas geográficas, en especial en países europeos de clima templado a frío, en Canadá y menos frecuentemente en los EE.UU.¹³. En la Argentina es

extremadamente raro. Se lo aislado de alimentos y de aguas en diversas zonas del país^{23, 24, 25, 26, 33, 36, 37}, pero son muy escasas las notificaciones de casos humanos de diarrea por *Y. enterocolitica*. Se sospecha que esto se debe en gran parte a la falta de inclusión de métodos adecuados para su aislamiento primario a partir de muestras de materia fecal. Los primeros aislamientos clínicos se realizaron durante la década de los 80^{31, 71}.

Entre 2008 y 2009 se detectó la presencia de *Y. enterocolitica* como único enteropatógeno en 6 muestras de materia fecal provenientes de pacientes pediátricos de 3 a 8 años de la ciudad de Córdoba. Todas las muestras analizadas presentaron campo cubierto de leucocitos²².

Características culturales

El aislamiento de *Y. enterocolitica* a partir de muestras clínicas, ambientales y de alimentos es bastante dificultoso. Los métodos convencionales de cultivo adolecen de ciertas limitaciones: son poco sensibles, requieren de tiempos prolongados de incubación, no es fácil la identificación a nivel de especie y tampoco resulta sencillo discriminar entre cepas patógenas de no patógenas.

Es capaz de reproducirse a 4°C.

Existe un medio selectivo (Agar CIN) (BD Yersinia Selective Agar®, BD, EE.UU.). Contiene cefsulodina, irgasan y novobiocina y sirve también para el aislamiento de *Aeromonas* en otra versión con menor contenido de cefsulodina. En ambos medios, las peptonas proporcionan nutrientes. La fermentación de

manitol en presencia de rojo neutro crea el aspecto característico de “ojo de toro” de las colonias de *Y. enterocolitica*: incoloras con centros de color rojo en ambos medios.

La inhibición selectiva de microorganismos gram negativos y gram positivos se obtiene mediante cristal violeta, desoxicolato sódico y los agentes antimicrobianos nombrados. En el BD Aeromonas Yersinia Agar®, las especies de *Aeromonas* producen colonias pálidas con centro rojo, similares a las de *Yersinia*. BD Yersinia Selective Agar® y BD Aeromonas Yersinia Agar® también pueden utilizarse para el aislamiento de las especies de *Yersinia* diferentes de *Y. enterocolitica*, como *Y. pseudotuberculosis*^{3, 8}.

Los métodos moleculares como la PCR permiten detectar a esta bacteria en forma rápida, con buena sensibilidad y especificidad⁴².

Aspectos patogénicos

La infección por Y. enterocolitica se inicia típicamente por ingestión de agua o alimentos contaminados. Una vez que se encuentra en el intestino delgado atraviesa la barrera a través de unas células epiteliales asociadas a los folículos linfoides y especializadas en la detección de antígenos (células M)^{13, 73}.

La adherencia y la invasión requieren al menos de dos genes cromosómicos: *inv* (invasina) y *ail* (del inglés: *attachment invasion locus*). Después de invadir el epitelio intestinal la bacteria se replica en los folículos (placas de Peyer). La presencia de un plásmido llamado pYV (del inglés:

plasmid for Yersinia virulence) permite la supervivencia y la multiplicación de *Y. enterocolitica*. La bacteria de este modo puede llegar a los ganglios mesentéricos y producir una linfadenitis.

El rol enteropatógeno de *Y. enterocolitica* está restringido a algunas serobiovariedades que contienen ese plásmido. Su presencia puede demostrarse por ensayos de autoaglutinación.

Y. enterocolitica, al igual que *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis*, infecta eficientemente a los ratones y en ellos se reproduce muy bien la patología observada en el hombre.

No todas las cepas de *Y. enterocolitica* son patógenas para el hombre. Incluso aquellas capaces de producir infecciones humanas pueden clasificarse en las que tienen la capacidad de causar infecciones sistémicas y pueden matar a los ratones en dosis relativamente bajas y las de bajo poder patógeno que no son letales para los ratones.

Como ya se mencionó, ciertos bioserotipos de *Y. enterocolitica* son los que pueden producir infecciones humanas: 1B/O:8; 2/O:5,27; 2/O:9; 3/O:3; 4/O:3. Su distribución geográfica es diversa. En Europa, Japón, Canadá y EE.UU. predomina el bioserotipo 4/O:3¹³.

Las cepas de cinco biotipos (1B, 2, 3, 4 y 5) pueden ser portadoras del plásmido de virulencia pYV además de presentar otros marcadores cromosómicos. Las cepas del biotipo 1A carecen de los marcadores de virulencia asociados al plásmido pYV y se consideran como no patógenas. No obstante, hay evidencia epidemiológica y experimental que sugiere que algunas cepas de este biotipo pueden causar infecciones gastrointestinales⁸⁴.

Varios estudios han investigado la distribución de diferentes genes de virulencia entre cepas de *Y. enterocolitica* por métodos moleculares: *ail*, *inv*, *yst*, *yadA*, *virF* y *yopT*^{35, 50, 60, 87}.

Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento

La mayoría de los aislamientos de *Y. enterocolitica* presenta resistencia a la ampicilina mediada por dos β -lactamasas: *blaA* y *blaB*. Se encontró en una serie de 186 aislamientos que el 99% tenían los genes *blaA* y *blaB* para producirlas, pero solo el 89% expresaba ambas enzimas¹¹. El 92% resultaron resistentes a la ampicilina.

Y. enterocolitica suele ser sensible a la piperacilina y a las cefalosporinas de tercera generación. La resistencia a otros antibióticos es variable: 10% R a TMS, entre 2,5 y 12% R a tetraciclina, 2% R a amicacina, entre 5% y 13% a estreptomicina^{11, 67}. En Suiza se encontró que los aislamientos de los bioserotipos 2/O:5,27 y 2/O:9, pero no los del bioserotipo 4/O:3, eran resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico y a cefoxitina⁴¹.

La resistencia a fluoroquinolonas es excepcional aunque se han detectado tres aislamientos resistentes a ácido nalidíxico por mutaciones en el gen *gyrA*³⁰.

El tratamiento de elección, en los casos graves, parece ser justamente la administración de fluoroquinolonas solas o en combinación con cefalosporinas de tercera generación⁴⁷. Estas últimas fueron efectivas en el tratamiento de 12 casos de bacteriemias en pacientes pediátricos¹.

Yersinia pestis

Aspectos taxonómicos

Bautizada primeramente como *Pasteurella pestis*, actualmente es el miembro tristemente célebre del género *Yersinia*: *Yersinia pestis* es el agente causal de la peste bubónica y de la peste neumónica.

Ha derivado como un clon de *Yersinia pseudotuberculosis*. Este evento, relativamente reciente, es la causa por la cual la diversidad genética es escasa y los métodos de subtipificación son poco efectivos⁹⁴.

Importancia clínica y epidemiología

La peste fue una de las enfermedades más devastadoras que afectaron a la humanidad. Se estima que en el curso de tres pandemias históricas produjo la muerte de cientos de millones de personas. A pesar de las actuales medidas de higiene y control de enfermedades infecciosas, del advenimiento de los antibióticos y de la mejora en la calidad de los insecticidas, la peste todavía es un tema importante para la salud pública en algunos países del mundo⁷² y un arma potencial para el bioterrorismo⁷⁶. La mayor parte de los casos son de peste bubónica. Los pacientes presentan lo que se conoce como “bubones”, que son ganglios linfáticos inflamados en la zona inguinal, femoral y axilar. Otras formas de presentación son la septicémica (las bacterias están en

la sangre circulante pero no se localizan en ganglios) y la neumónica, con tos e infiltrados pulmonares.

La peste en Sudamérica

Durante la tercera pandemia que se inició en Hong Kong a fines del siglo XIX, la peste se diseminó a muchos países del mundo y llegó a América del Sur. Aún entre 1994 y 1999, cuatro países sudamericanos sumados a los EE.UU. notificaron más de 1.700 casos y casi 80 muertes relacionadas³⁴.

En Sudamérica fueron identificadas 50 especies de roedores, un lagomorfo y dos marsupiales como reservorios de *Y. pestis*. Quince especies estuvieron involucradas en la peste de Argentina, 10 en Bolivia, siete en Perú, 9 en Ecuador, y 9 en Brasil. En los últimos veinte años solo se registraron casos en Bolivia, Brasil, Ecuador y Perú^{12, 69}.

Según algunos autores, la peste podría haber sido introducida en América Latina desde Paraguay, en 1899. Luego se diseminó hacia Brasil y Argentina. No obstante hay un relato que indica que se introdujo por el Río de la Plata y llegó antes al puerto de Rosario que al Paraguay (ver más adelante).

En poco tiempo llegó a afectar a 14 de los 25 países estudiados (Tabla 2). Como ya se mencionó, actualmente solo persiste en regiones endémicas selváticas de Bolivia, Brasil, Ecuador y Perú⁸⁰.

Tabla 2. Distribución de la peste en 14 países de América Latina desde 1899 hasta 2012

Años	AR G	BO L	BR A	CH I	CU B	EC U	SA L	ME X	PA N	PA R	PE R	PR I	UR U	VE N
1899 - 1909	x		x	x		x		x	x	x	x		x	x
1910 - 1919	x				x	x					x	x		x
1920 - 1929		x	x			x		x			x	x	x	x
1930 - 1939	x	x	x	x		x					x		x	x
1940 - 1949	x	x	x			x					x			x
1950 - 1959	x	x	x			x	x				x			x
1960 - 1969		x	x			x					x			x
1970 - 2012		x	x			x					x			

ARG: Argentina, BOL: Bolivia, BRA: Brasil, CHI: Chile, CUB: Cuba, ECU: Ecuador, SAL: El Salvador, MEX: México, PAN: Panamá, PAR: Paraguay, PER: Perú, PRI: Puerto Rico, URU: Uruguay, VEN: Venezuela.

La peste parece haber entrado a la Argentina por el puerto de Rosario en 1899 a través de un marinero que viajaba al Paraguay en una nave que había recibido en Montevideo una carga procedente de la India. Días después murieron otros dos marineros pero el mal no se había diagnosticado. Desde Rosario se propagó a Buenos Aires en 1900, donde se produjeron 124 casos. Desde entonces se ha producido un número variable de casos anuales (entre 50 y 100) hasta 1919, en que se observó un aumento de casos (N = 150). Desde 1920 en adelante, se observó un descenso hasta 1931, probablemente

gracias a tareas de desratización. Entre 1940 y 1960 existieron algunos casos esporádicos de peste bubónica en algunos barrios de Buenos Aires. A partir de entonces no se registraron más casos en la Argentina⁵².

La peste en el siglo XXI

En el siglo XX la peste fue el motivo de una alta mortalidad en la India y en el Sudeste asiático. En los primeros nueve años del siglo XXI se reportaron 21.725 casos de peste con 1.612 muertes (relación caso/fatalidad del 7,4%). El país más afectado fue la República del Congo, donde se registraron incluso dos grandes brotes de peste neumónica.

En los EE.UU. hay zonas endémicas donde anualmente se producen algunos casos. En 2006 en los se informaron 13 casos y dos muertes en los estados de Nuevo México, Colorado, California y Texas¹⁷. Más recientemente se describió la transmisión a través de un perro a tres hombres y la posibilidad de que un caso haya sido por transmisión hombre-hombre⁷⁷.

Son destacables dos accidentes fatales vinculados a problemas de bioseguridad: un biólogo que practicó una autopsia a un puma afectado y un genetista con hemocromatosis subclínica que manipuló una cepa avirulenta de *Y. pestis*.

La peste en la actualidad es endémica en 26 países del mundo. Se sabe que persiste por la presencia de roedores silvestres que actúan como verdaderos reservorios de *Y. pestis*, sobre todo en África. Entre 2004 y 2009 se registraron más de 2.000 casos anuales de los cuales más del 90% eran de la República Democrática del Congo y de Madagascar¹⁶.

. En Argelia, como lo predijera Albert Camus en su novela “La Peste”, después de 50 años, esta enfermedad reemergió en 2003, con 18 casos y una muerte⁷.

Según la OMS en 2012 los casos fueron 400 y las muertes 75. La mayoría de éstas se originaron por la demora en el comienzo del tratamiento antibiótico.

Diagnóstico microbiológico

Un diagnóstico presuntivo rápido puede realizarse por punción de los bubones y coloración de Gram. El cultivo ha sido el método tradicional de elección²¹. Actualmente se dispone de métodos inmunológicos (enzimoinmunoensayo dirigido a la detección del antígeno F1) y moleculares (PCR)^{19, 20, 75}.

Patogenia

La peste se transmite a través de la picadura de pulgas de roedores. Las pulgas que no tienen su aparato digestivo bloqueado por sangre coagulada son mejores transmisoras de la enfermedad que las que sí lo tienen.

Y. pestis es una bacteria intracelular facultativa. Es capaz de invadir distintos tipos de células (invasión) y contrarrestar el efecto de los fagocitos (antifagocitosis). Los mecanismos por los cuales esta bacteria cumple con esas funciones aún no están del todo claros⁵⁸.

Los seres humanos adquieren la enfermedad especialmente tras la muerte de los roedores dado que las pulgas buscan nuevos hospedadores que les provean de sangre. El período de incubación es de 2 a 10 días.

El vector más eficiente es la pulga *Xenopsylla cheopis*, pero muchas otras pueden transmitir la peste. La mayor parte de las pulgas provienen de las ratas domésticas (*Rattus rattus* o *Rattus norvegicus*). Otros animales que pueden albergar pulgas infectadas en los EE.UU. son los antílopes de cola blanca, los conejos, los perros de las praderas, las ardillas y otros roedores silvestres.

Se han observado picos estacionales diferentes según la zona geográfica de que se trate: en los EE.UU. entre febrero y agosto, en Vietnam entre enero y abril, en Madagascar entre octubre y febrero y en Tanzania entre diciembre y marzo⁹.

Al igual que *Y. pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica*, *Y. pestis* es portadora de un plásmido de 70 kilobases (kb) de ADN llamado pYV o pCD1. Este plásmido codifica un sistema de secreción de tipo III, proteínas externas (Yops) y el antígeno V. Solo *Y. pestis* tiene un plásmido adicional de ~100-kb llamado pFra o pMT1, que codifica una proteína capsular antifagocítica llamada fracción 1 (F1) y la toxina murina y otro plásmido de 9,5-kb llamado pPst o pPCP1, que codifica el activador de plasminógeno y la bacteriocina llamada pesticina.

La muerte del individuo ocurre después de la replicación inicial de la bacteria en el interior de los fagocitos, seguida de la proliferación extracelular explosiva de los microorganismos que conduce a una bacteriemia y a la inflamación y necrosis de los ganglios linfáticos, el bazo y el hígado. Otros

factores de virulencia son la lipoproteína de la membrana externa y las adhesinas^{15, 38, 81, 82}.

Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento

El uso de antibióticos para el tratamiento de la peste comenzó en 1938 con las sulfamidas y continuó en 1946 con la estreptomicina, lo cual derivó en un importante descenso de la mortalidad. Actualmente es de menos del 8%. La supervivencia de los pacientes depende de la precocidad del tratamiento, especialmente en la septicemia y en la peste neumónica.

La mayoría de las cepas de *Y. pestis* son resistentes a las polimixinas y los macrólidos pero son uniformemente sensibles a otros antibióticos empleados para bacilos gram negativos^{39, 40, 51}.

Los antibióticos más recomendados son estreptomicina, tetraciclina y cloranfenicol, este último indicado en casos de meningitis⁶. La gentamicina ha sustituido en muchos países a la estreptomicina y se la administra sola o en combinación con tetraciclinas. Las fluoroquinolonas parecen ser alternativas eficaces según estudios *in vitro* y en modelo murino, pero todavía la experiencia clínica es muy escasa^{40, 51}.

Aunque las cefalosporinas se han considerado inefectivas para el tratamiento de la peste²⁸, su actividad *in vitro* y en modelos animales ha sido comparable a la de los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas^{10, 40}.

Muy pocas cepas multirresistentes (resistentes a ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, sulfamidas y estreptomicina) solo han sido

detectadas en la isla de Madagascar^{46, 49}. Los pacientes fueron curados con la administración de estreptomicina intramuscular y trimetoprima-sulfametoxazol por vía oral. Los genes de resistencia [*bla*_{TEM-1}, *catI*, *aph(3')-I*, *sul1*, *ant3''9* y *tet(D)*] estaban alojados en un plásmido conjugativo de aproximadamente 150 kb⁴⁵.

Vacunas

Las antiguas vacunas han sido utilizadas durante más de cincuenta años en áreas endémicas y en personal militar destinado a Vietnam. Sin embargo, esta vacuna preparada con bacterias enteras muertas con formalina no protege contra la forma neumónica y fue discontinuada en 1998. La vacuna preparada con bacterias vivas atenuadas EV76 fue utilizada en Europa durante mucho tiempo, pero actualmente no se comercializa.

Se desarrolló una nueva vacuna que contiene los antígenos F1 y V de *Y. pestis* y que demostró generar una buena respuesta de anticuerpos sin producir efectos colaterales. No obstante, todavía quedan dudas acerca de su efectividad en la prevención de la peste neumónica, que tiene una fase intracelular y podría requerir de una respuesta celular para producir protección⁷⁰.

Yersinia pseudotuberculosis

Importancia clínica y epidemiología

Yersinia pseudotuberculosis es una bacteria enteropatógena que se transmite a través de la vía fecal-oral y tiene numerosos reservorios animales⁴³. Fue aislada por primera vez en 1883 en cobayos, a partir de lesiones similares a las tuberculosas⁴.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes en el hombre son la enterocolitis, la ileítis terminal, la pseudoapendicitis (dolor abdominal), la bacteriemia y otras formas diseminadas (especialmente en pacientes con condiciones predisponentes)^{57, 64, 93}.

En algunas áreas específicas como Rusia y Japón *Y. pseudotuberculosis* puede causar una enfermedad conocida como escarlatina del Lejano Oriente (FESLF, del inglés *Far East scarlet-like fever*)^{4, 32, 63, 79}.

Esta enfermedad se caracteriza por presentar síntomas inflamatorios graves, acompañados de problemas intestinales.

La frecuencia de *Y. pseudotuberculosis* es menor a la de *Y. enterocolitica* como patógeno humano. No obstante se describieron varios brotes en distintas partes del mundo: Japón^{53, 89}, Rusia⁹⁰, Francia²⁷ y Finlandia^{56, 86}.

En la Argentina *Y. pseudotuberculosis* fue aislada por primera vez en 1978 a propósito de un brote familiar de diarrea aguda que afectó a 5 personas a partir de un cobayo enfermo⁴⁴. Posteriormente se la aisló de ganado bovino⁶⁶ y de casos esporádicos en seres humanos⁹⁵.

Serotipificación y tipificación molecular

Y. pseudotuberculosis se subdivide en 15 serotipos y en varios subserotipos. Los serotipos más comunes son el O:1, O:2, O:3, O:4 y O:5. Otros serotipos están restringidos a ciertas áreas geográficas del continente asiático. La mayor parte de las infecciones humanas se deben a los serotipos O:1 y O:3⁹¹.

Y. pseudotuberculosis exhibe un cierto grado de polimorfismos genéticos, por eso un método frecuentemente utilizado en epidemiología molecular es el RFLP (*restriction fragment length polymorphism*)^{29, 54, 68}.

Recientemente se ha utilizado el método de tipificación por secuenciación enzimática multilocus (MLST). Por este método se pudieron discriminar 52 secuenciotipos⁵⁹.

Sensibilidad a los antibióticos

Y. pseudotuberculosis es más sensible a los antibióticos que *Y. enterocolitica*. De hecho en un estudio se encontró que ninguna de las cepas ensayadas tenía los genes ni expresaba β -lactamasas¹¹. Las cepas ensayadas fueron todas sensibles a ampicilina, sulfamidas, tetraciclina y estreptomicina.

En otro estudio realizado con yersinias obtenidas de cerdos, se encontraron cepas resistentes a las sulfamidas pero no a la ampicilina, a cefalosporinas de primera y tercera generación, al aztreonam, a la tetraciclina, a la estreptomicina ni a las fluoroquinolonas⁸⁵.

Bibliografía

1. Abdel-Haq NM1, Papadopol R, Asmar BI, Brown WJ. Antibiotic susceptibilities of *Yersinia enterocolitica* recovered from children over a 12-year period. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27:449-52.
2. Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiyoule A, Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:14043-8
3. Altorfer R, Altorfer R, Altwegg M, Zollinger-Iten J, von Graevenitz A. Growth of *Aeromonas* spp. on cefsulodin-irgasan-novobiocin agar selective for *Yersinia enterocolitica*. *J Clin Microbiol*. 1985; 22: 478-80.
4. Amphlett A. Far East scarlet-like fever: a review of the epidemiology, symptomatology, and role of superantigenic toxin: *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen A. *Open Forum Infect Dis*. 2015;3:ofv202. doi: 10.1093/ofid/ofv202. eCollection 2016.
5. Azghari I, Bargach A, Moatassim Billah N, Essaoudi MA, Jahid A, Kabbaj N. Ileocecal resection for massive rectal bleeding due to *Yersinia enterocolitica*: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep*. 2016;10:6.
6. Bames AM, Quan TJ. Plague. En: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR, editors. *Infectious diseases*. Philadelphia, Pa, W. B. Saunders Company, 1992, p. 1285-91.
7. Betherat E, Bekhoucha S, Chougrani S, Razik F, Duchemin JB, Houti L, Deharib L, Fayolle C, Makrrougrass B, Dali-Yahia R, Bellal R, Belhabri L, Chaieb A, Tikhomirov E, Carniel E. Plague reappearance in Algeria after 50 years, 2003. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1459-62.
8. Bockemühl J, Wong JD. 2003. *Yersinia*. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (editors). *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 2003.
9. Boisier P, Rahalison L, Rasolomaharo M, Ratsitorahina M, Mahafaly M, Razafimahefa M, Duplantier JM, Ratsifasoamanana L, Chanteau S. Epidemiologic features of four

- successive annual outbreaks of bubonic plague in Mahajanga, Madagascar. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:311-6.
10. Bonacorsi SP, Scavizzi MR, Guiyoule A, Amouroux JH, Carniel E. Assessment of a fluoroquinolone, three β -lactams, two aminoglycosides, and a cycline in treatment of murine *Yersinia pestis* infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; 38:481-6.
 11. Bonke R, Wacheck S, Stüber E, Meyer C, Märtilbauer E, Fredriksson-Ahomaa M. Antimicrobial susceptibility and distribution of β -lactamase A (blaA) and β -lactamase B (blaB) genes in enteropathogenic *Yersinia* species. *Microb Drug Resist.* 2011;17:575-81.
 12. Bonvicino CR, Oliveira JA, Cordeiro-Estrela P, D'andrea PS, Almeida AM. A taxonomic update of small mammal plague reservoirs in South America. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2015;15:571-9.
 13. Bottone EJ. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microb Infect.* 1999;1: 323–33.
 14. Bottone EJ. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10:257–76.
 15. Brubaker RR. How the structural gene products of *Yersinia pestis* relate to virulence. *Future Microbiol.* 2007;2:377-85.
 16. Butler T. Plague into the 21st century. *Clin Infect Dis.* 2009;49:736-42.
 17. Centers for Disease Control and Prevention. Human plague—four states, 2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2006;55:940-4.
 18. Chan J, Gandhi RT. A case of septic arthritis of the shoulder due to *Yersinia enterocolitica* with review of the literature. *Open Forum Infect Dis.* 2014 Aug 2;1(2):ofu054.
 19. Chanteau S, Rahalison L, Ralafiarisoa L, Foulon J, Ratsitorahina M, Ratsifasoamanana L, Carniel E, Nato F. Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *Lancet.* 2003;361:211-6.
 20. Chanteau S, Rahalison L, Ratsitorahina M, Mahafaly, Rasolomaharo M, Boisier P, O'Brien T, Aldrich J, Keleher A, Morgan C, Burans J. Early diagnosis of bubonic plague

- using F1 antigen capture ELISA assay and rapid immunogold dipstick. *Int J Med Microbiol.* 2000;290:279-83.
21. Chu MC. Laboratory manual for plague diagnostic tests. Geneva, Switzerland: Centers for Disease Control and Prevention and World Health Organization, 2000.
 22. Cortés PR, Contreras Funes V, Huerta VG, Dichiara DM. *Yersinia enterocolitica* en la materia fecal de 6 pacientes pediátricos de la ciudad de Córdoba. *Rev Argent Microbiol.* 2010;42:79.
 23. de Centorbi OP, de Guzmán AC, de Cuadrado AA, Laciari AL, Alcaraz LE, de Milán MC, de Pederiva NB. Determination of the sanitary quality and detection of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in ice cream. *Rev Argent Microbiol.* 1989;21:63-9.
 24. de Guzmán AM, de Pederiva NB, Eiguer T, Caffer MI, Fronckowsky B. Bacteria of the genus *Yersinia* in chickens for human consumption and in balanced bird food. *Rev Argent Microbiol.* 1991;23:35-40.
 25. de Guzmán AM, de Pederiva NB, Torres CN, Eiguer T, Giménez DF. *Yersinia enterocolitica*: 1st isolation from meat products in Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 1984;16:49-56.
 26. de Guzmán AM, Micalizzi B, de Pederiva NB, Torres Pagano CE, Eiguer T, Giménez DF. Virulence and enterotoxigenicity of *Yersinia enterocolitica* isolated from foods and other biological material. *Rev Argent Microbiol.* 1985;17:195-201.
 27. De Smet P, Van Ussel E. 1966. Toxi-infection alimentaire collective par *Pasteurella pseudotuberculosis*. *Acta Gastroenterol Belg.* 1966;29:341–50.
 28. Dennis DT. Multidrug resistance in plague. *N Engl J Med.* 1997;337:702-4.
 29. Dolina M, Peduzzi R. Population genetics of human, animal, and environmental *Yersinia* strains. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59:442–50.
 30. Drummond N, Stephan R, Houghton P, Murphy BP, Fanning S. Further characterization of three *Yersinia enterocolitica* strains with a nalidixic acid-resistant phenotype isolated from humans with diarrhea. *Foodborne Pathog Dis.* 2013;10:744-6.
 31. Eiguer T, Mercado EC, Fronckowsky B, Foguelman A, Fernández E, Marguet R, Pratalongo JP, Urbano FF, Ibáñez SB, Ruiz Trevisan A. Initial isolation and

- characterization of *Yersinia enterocolitica* in human feces in Argentina. Rev Argent Microbiol. 1987;19:71-6.
32. Eppinger M, Rosovitz MJ, Fricke WF, Rasko DA, Kokorina G, Fayolle C, Lindler LE, Carniel E, Ravel J. The complete genome sequence of *Yersinia pseudotuberculosis* IP31758, the causative agent of Far East scarlet-like fever. PLoS Genet. 2007; 3:e142. 10.1371/journal.pgen.0030142
 33. Escudero ME, Eiguer T, Caffer MI, Fronchkowsky B, Fernández Cobo M, Stefanini de Guzmán AM. *Yersinia enterocolitica* strains of bovine origin isolated in San Luis, Argentina: virulence, enterotoxigenicity, and antibiotic sensitivity. Rev Latinoam Microbiol. 1991;33:121-5.
 34. Faccini-Martínez ÁA, Sotomayor HA. Reseña histórica de la peste en Suramérica: una enfermedad poco conocida en Colombia. Biomedica. 2013;33:8-27
 35. Falcão JP, Brocchi M, Proença-Módena JL, Acrani GO, Corrêa EF, Falcão DP. Virulence characteristics and epidemiology of *Yersinia enterocolitica* and yersiniae other than *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis* isolated from water and sewage. J Appl Microbiol. 2004;96:1230-6.
 36. Favier GI, Escudero ME, de Guzmán AM. Genotypic and phenotypic characteristics of *Yersinia enterocolitica* isolated from the surface of chicken eggshells obtained in Argentina. J Food Prot. 2005;68:1812-5.
 37. Floccari ME, Peso OA. *Yersinia enterocolitica* and related species in the sewage discharge from the city of Buenos Aires: use of Schiemann medium in their isolation. Rev Argent Microbiol. 1984;16:57-66.
 38. Forman S, Wulff CR, Myers-Morales T, Cowan C, Perry RD, Straley SC. *yadBC* of *Yersinia pestis*, a new virulence determinant for bubonic plague. Infect Immun. 2008;76:578-87.
 39. Frean J, Klugman KP, Arntzen L, Bukofzer S. Susceptibility of *Yersinia pestis* to novel and conventional antimicrobial agents. J Antimicrob Chemother. 2003;52:294-6.
 40. Frean JA, Arntzen L, Capper T, A. Bryskier, Klugman KP. In vitro activities of 14 antibiotics against 100 human isolates of *Yersinia pestis* from a southern African plague focus. Antimicrob Agents Chemother. 1996;40:2646-7.

41. Fredriksson-Ahomaa M, Cernela N, Hächler H, Stephan R. *Yersinia enterocolitica* strains associated with human infections in Switzerland 2001-2010. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31:1543-50
42. Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A, Korkeala H. Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006;47:315-29.
43. Fukushima H, Gomyoda M, Kaneko S. Wild animals as the source of infection with *Yersinia pseudotuberculosis* in Shimane Prefecture, Japan. Contrib Microbiol Immunol. 1991; 12:1–4.
44. Furowicz AJ, Bagnat E, Terzolo HR, Crenovich H, Pessaco A, Pereira JJ, Zamora AS, de Verona AZ. Primer aislamiento en la Argentina de *Yersinia pseudotuberculosis* (bacilo de Malassez y Vignal) de un cobayo (*Cavia porcellus*) y de materia fecal humana. Medicina (Buenos Aires). 1978;38:45-52.
45. Galimand M, Carniel E, Courvalin P. Resistance of *Yersinia pestis* to antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:3233-6.
46. Galimand M, Guiyoule A, Gerbaud G, Rasoamanana B, Chanteau S, Carniel E, Courvalin P. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. N Engl J Med. 1997; 337:677-80.
47. Gayraud M, Scavizzi MR, Mollaret HH, Guillemin L, Hornstein MJ. Antibiotic treatment of *Yersinia enterocolitica* septicemia: a retrospective review of 43 cases. Clin Infect Dis. 1993;17:405–10.
48. Guinet F, Carniel E, Leclercq A. Transfusion-transmitted *Yersinia enterocolitica* sepsis. Clin Infect Dis. 2011;53:583-91.
49. Guiyoule A, Gerbaud G, Buchrieser C, Galimand M, Rahalison L, Chanteau S, Courvalin P, Carniel E. Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in a clinical isolate of *Yersinia pestis*. Emerg Infect Dis. 2001;7:43-8.
50. Gürtler M, Alter T, Kasimir S, Linnebur M, Fehlhaber K. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in fattening pigs. J Food Prot. 2005;68:850-4.
51. Hernandez E, Girardet M, Ramisse F, Vidal D, Cavallo JD. Antibiotic susceptibilities of 64 isolates of *Yersinia pestis* to 24 antimicrobial agents. J Antimicrob Chemother. 2003;52:1029-31.

52. <http://www.adecra.org.ar/comercio64/html/460437Las%20epidemias%20en%20la%20Argentina.pdf>
53. Inoue M, Nakashima H, Ueba O, Ishida T, Date H, Kobashi S, Takagi K, Nishu T, Tsubokura M. Community outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis*. Microbiol Immunol. 1984;28:883–91.
54. Iteman I, Najdenski H, Carniel E. High genomic polymorphism in *Yersinia pseudotuberculosis*. En: Ravagnan G, Chiesa C, editors. Yersiniosis: present and future, vol 13. Postfach, Basel, Switzerland, Karger, 1995, p. 106–11.
55. Ito T, Suzuki T, Nanao K, Kawase J, Fukushima H. *Yersinia enterocolitica* bacteremia and enterocolitis in a previously healthy 20-month-old girl. J Infect Chemother. 2012;18:756–9.
56. Jalava K, Hallanvuo S, Nakari UM, Ruutu P, Kela E, Heināsmäki T, Siitonen A, Nuorti JP. Multiple outbreaks of *Yersinia pseudotuberculosis* infections in Finland. J Clin Microbiol. 2004;42:2789–91.
57. Kaasch AJ, Dinter J, Goeser T, Plum G, Seifert H. *Yersinia pseudotuberculosis* bloodstream infection and septic arthritis: case report and review of the literature. Infection. 2012;40:185-9
58. Ke Y, Chen Z, Yang R. *Yersinia pestis*: mechanisms of entry into and resistance to the host cell. Front Cell Infect Microbiol. 2013 Dec 24;3:106. doi: 10.3389/fcimb.2013.00106. eCollection 2013.
59. Laukkanen-Ninios R, Didelot X, Jolley KA, Morelli G, Sangal V, Kristo P, Brehony C, Imori PF, Fukushima H, Siitonen A, Tseneva G, Voskressenskaya E, Falcao JP, Korkeala H, Maiden MC, Mazzoni C, Carniel E, Skurnik M, Achtman M. 2011. Population structure of the *Yersinia pseudotuberculosis* complex according to multilocus sequence typing. Environ Microbiol. 2011; 13:3114–27.
60. Lee TS, Lee SW, Seok WS, Yoo MY, Yoon JW, Park BK, Moon KD, Oh DH. Prevalence, antibiotic susceptibility, and virulence factors of *Yersinia enterocolitica* and related species from ready-to-eat vegetables available in Korea. J Food Prot. 2004;67:1123-7.
61. Leo JC, Skurnik M. Adhesins of human pathogens from the genus *Yersinia*. Adv Exp Med Biol. 2011;715:1-15.

62. Merhej V1, Adékambi T, Pagnier I, Raoult D, Drancourt M. *Yersinia massiliensis* sp. nov., isolated from fresh water. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008;58(Pt 4):779-84.
63. Mollaret HH, Carniel E, Guilvout I. La fièvre scarlatiniforme d'Extrême Orient. *Med. Mal. Infec.* 1990; 20:519–29.
64. Mollaret HH. Les formes cliniques de l'infection humaine à bacille de Malassez et Vignal. *Pathol Biol*. 1965;13:554–6
65. Nemoto H, Murabayashi K, Kawamura Y, Sasaki K, Wakata N, Kinoshita M, Furube M. Multiple liver abscesses secondary to *Yersinia enterocolitica*. *Intern Med*. 1992;31:1125-7.
66. Noceda RP, Martínez AH, Bardon JC, Cordeviola JM, Massigoge A, Hernaiz R. *Yersinia pseudotuberculosis* en bovinos de la Provincia de Buenos Aires. *Veterinaria Argentina*. 1990; 7:385-8.
67. Novoslovskij A, Kudirkienė E, Marcinkutė A, Bajoriūnienė A, Korkeala H, Malakauskas M. Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* isolated from pigs and humans in Lithuania. *J Sci Food Agric*. 2013;93:1858-62
68. Odaert M, Berche P, Simonet M. 1996. Molecular typing of *Yersinia pseudotuberculosis* by using an IS200-like element. *J Clin Microbiol*. 1996;34:2231–5.
69. PAHO. Health in the Americas - Regional Outlook and Country Profiles. Washington D.C.: Pan American Health Organization, 2012.
70. Parent MA, Berggren KN, Kummer LW, Wilhelm LB, Szaba FM, Mullarky IK, Smiley ST. Cell-mediated protection against pulmonary *Yersinia pestis* infection. *Infect Immun* 2005;73:7304-10.
71. Paz M, Muzio H, Teves S, Santini P. Analysis of a *Yersinia enterocolitica* isolated from human diarrheic feces in Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2004;36:164-9.
72. Perry RD, Fetherston JD. *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10:35-66.
73. Pujol C, Bliska JB. Turning *Yersinia* pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. *Clin Microbiol*. 2005;114:216–26.
74. Pulvirenti D, Aikaterini T, Neri S. Septicemia, hepatic abscess, and encephalitis due to *Yersinia enterocolitica*. *J Clin Gastroenterol*. 2007;41:333–4.

75. Rahalison L, Vololonirina E, Ratsitorahina M, Chanteau S. Diagnosis of bubonic plague by PCR in Madagascar under field conditions. *J Clin Microbiol.* 2000;38:260-3.
76. Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, Ostroff SM, Hughes JM. Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:225-30.
77. Runfola JK, House J, Miller L, Colton L, Hite D, Hawley A, Mead P, Schriefer M, Petersen J, Casaceli C, Erlandson KM, Foster C, Pabilonia KL, Mason G, Douglas JM Jr; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of human pneumonic plague with dog-to-human and possible human-to-human transmission--Colorado, June-July 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2015;64:429-34.
78. Saebø A, Lassen J. Acute and chronic gastrointestinal manifestations associated with *Yersinia enterocolitica* infection. A Norwegian 10-year followup study on 458 hospitalized patients. *Ann Surg.* 1992;215:250-5.
79. Sato K, Ouchi K, Taki M. *Yersinia pseudotuberculosis* infection in children, resembling Izumi fever and Kawasaki syndrome. *Pediatr Infect Dis.* 1983; 2:123-6.
80. Schneider MC, Najera P, Aldighieri S, Galan DI, Bertherat E, Ruiz A, Dumit E, Gabastou JM, Espinal MA. Where does human plague still persist in Latin America? *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e2680.
81. Sebbane F, Gardner D, Long D, Gowen BB, Hinnebusch BJ. Kinetics of disease progression and host response in a rat model of bubonic plague. *Am J Pathol.* 2005;166:1427-39.
82. Sha J, Agar SL, Baze WB, Olano JP, Fadl AA, Erova TE, Wang S, Foltz SM, Suarez G, Motin VL, Chauhan S, Klimpel GR, Peterson JW, Chopra AK. Braun lipoprotein (Lpp) contributes to virulence of yersiniae: potential role of Lpp in inducing bubonic and pneumonic plague. *Infect Immun.* 2008;76:1390-409.
83. Sprague LD, Neubauer H. *Yersinia aleksiciae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005;55(Pt 2):831-5.,
84. Tennant SM, Grant TH, Robins-Browne RM. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;38:127-37.

85. Terentjeva M, Bērziņš A. Prevalence and antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in slaughter pigs in Latvia. J Food Prot. 2010;73:1335-8.
86. Terti R, Granfors K, Lehtonen OP, Rimhanen-Finne R, Niskanen T, Hallanvuo S, Makary P, Haukka K, Pajunen S, Siitonen A, Ristolainen R, Pöyry H, Ollgren J, Kuusi M. *Yersinia pseudotuberculosis* causing a large outbreak associated with carrots in Finland, 2006. Epidemiol. Infect. 2009;137:342–7.
87. Thoerner P, Bin Kingombe CI, Bögli-Stuber K, Bissig-Choisat B, Wassenaar TM, Frey J, Jemmi T. PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution. Appl Environ Microbiol. 2003;69:1810-6.
88. Tiddia F, Cherchi GB, Pacifico L, Chiesa C. *Yersinia enterocolitica* causing suppurative arthritis of the shoulder. J Clin Pathol. 1994;47:760-1.
89. Toyokawa Y, Ohtomo Y, Akiyama T, Masuda K, Kasai M, Kaneko S, Maruyama T. 1993. Large scale outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* serotype 5a infection at Noheji-machi in Aomori Prefecture. Kansenshogaku Zasshi. 1993;67:36–44.
90. Tseneva GY, Chesnokova MV, Timofeevich KV, Aleksandrovna VE, Burgasova OA, Sayapina LV, Aleksandrovna TK, Karimova TV. Pseudotuberculosis in the Russian federation. Adv Exp Med Biol. 2012;954:63–8.
91. Tsubokura M, Aleksić S. A simplified antigenic scheme for serotyping of *Yersinia pseudotuberculosis*: phenotypic characterization of reference strains and preparation of O and H factor sera. Contrib Microbiol Immunol. 1995;13:99–105.
92. Vantrappen G, Ponette E, Geboes K, Bertrand P. *Yersinia* enteritis and enterocolitis: gastroenterological aspects. Gastroenterology. 1977;72:220–7.
93. Vincent P, Leclercq A, Martin L, *Yersinia* Surveillance Network. Duez JM, Simonet M, Carniel E. Sudden onset of pseudotuberculosis in humans, France, 2004–05. Emerg Infect Dis. 2008;14:1119–22.
94. Vogler AJ, Keim P, Wagner DM. A review of methods for subtyping *Yersinia pestis*: from phenotypes to whole genome sequencing. Infect Genet Evol. 2016;37:21-36.

95. Yahni D, Lanza A, Smayevsky J, Temporiti E, Bonvehi P. Sepsis por *Yersinia pseudotuberculosis*. IV Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología. Mar del Plata, Argentina, 2004.

Budvicia

Aspectos taxonómicos

Budvicia aquatica, fue descrita por Bouvet en 1985²². Ésta era la única especie del género hasta 2013 en que se describió *Budvicia diplopodorum* como parte de la microbiota del tracto digestivo de diplópodos (miriápodos de la especie *Cylindroiulus fulviceps*)¹¹¹.

Características microbiológicas

Son bacilos gram negativos móviles por flagelos peritricos. Su movilidad es más acentuada a 22°C que a 36°C. También son bio químicamente más activos a 25°C. Crecen en los medios habituales para enterobacterias pero formando colonias puntuales a 36°C y unos cinco veces más grandes a 30°C.

Son ureasa y ONPG positivas y producen H₂Sen el TSI. Dan negativas las pruebas de indol, lisina, ornitina, arginina, citrato, Voges Proskauer, fenilalanina y DNasa²⁴.

Habitat, importancia clínica y sensibilidad a los antibióticos

El hábitat natural de *Budvicia aquatica* es la superficie del agua. También se la encontrado en el intestino de salmónidos y de seres humanos. Hasta hace poco se consideraba que no era patógena para el hombre, pero recientemente se la ha aislado de uro y hemocultivos de una mujer inmunocomprometida, de 85 años, que sufrió una sepsis como consecuencia del huracán Katrina³⁷.

También se aislaron secuencias características de su subunidad ribosomal 16S a partir de sangre de dos personas sanas¹³⁶.

Parece tener una β -lactamasa natural que le confiere resistencia a ampicilina y cefalosporinas de primera generación.

Buttiauxella

Aspectos taxonómicos

Hasta el momento hay descritas 7 especies de *Buttiauxella*, la mayoría de ellas definidas en 1996 por Müller et al.¹³⁷: *Buttiauxella agrestis*, *Buttiauxella*

brennerae, *Buttiauxella ferragutiae*, *Buttiauxella gaviniae*, *Buttiauxella izardii*, *Buttiauxella noackiae* y *Buttiauxella warmboldiae*. La especie tipo es *B. agrestis* y junto a *B. gaviniae* y *B.noackiae* son, hasta ahora, las únicas aisladas de seres humanos.

Habitat e importancia clínica

Son bacilos gram negativos pequeños, anaerobios facultativos que se los encuentra en el suelo y en el agua. También se han aislado de peces, insectos y moluscos¹⁰². Solo se han reportado unos pocos casos de infecciones humanas asociadas a *B. agrestis*⁵⁵.

B. gaviniae fue aislada de una muestra de orina de un paciente de 31 años con patología urológica derivada de una lesión traumática en la columna vertebral⁵².

Características microbiológicas

Miden entre 0,5 y 0,7 μm de ancho por 2-3 μm de largo y son móviles a 36°C con flagelos peritricos. La temperatura óptima de crecimiento está entre los 30°C y los 37°C; son psicrotolerantes, pueden desarrollarse muy lentamente a 4°C pero no lo hacen a 41°C. Crecen en los medios comunes para enterobacterias.

Además de las reacciones propias de todas las enterobacterias, dan positivas las pruebas de rojo de metilo, ONPG y gas de glucosa y dan negativas las de Voges Proskauer, indol, producción de H_2S en el TSI, ureasa y

DNasa²⁴. Las pruebas principales para diferenciar las distintas especies pueden verse en la tabla 1.

Sensibilidad a los antibióticos

Se han realizado unos pocos ensayos de sensibilidad a los antibióticos con *Buttiauxella*. En un trabajo, en 13 aislamientos de *B. agrestis*, se observó resistencia a ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, ticarcilina, cefalotina, cefoxitina, cefotaxima, doxiciclina, trimetoprima y cloranfenicol. Todas las cepas resultaron sensibles a gentamicina, amicacina y colistina^{11, 24}.

Contrariamente, en otro estudio sobre *Buttiauxella* spp. que incluyó solo un aislamiento de *B. agrestis* se reportó sensibilidad a ampicilina, ampicilina-sulbactama, piperacilina-tazobactama y cefalosporinas¹⁷³.

Tabla 1. Pruebas bioquímicas utilizadas para la diferenciación de las especies de *Buttiauxella*

Especies	CIT	PHE	LIS	ARG	ORN	MAL	ADO	LAC	MEL	RAF	SBL
<i>B. agrestis</i>	+	-	-	-	+	V	-	+	+	+	-
<i>B. brenneriae</i>	-	-	-	-	V	+	V	-	+	+	-
<i>B. ferragutiae</i>	-	-	+	-	V	-	-	-	-	-	+
<i>B. gaviniae</i>	V	-	-	V	-	+	+	+	-	-	-
<i>B. izardii</i>	-	-	-	-	+	+	-	+	V	V	-
<i>B. noackiae</i>	V	+	-	V	-	+	-	-	-	-	-
<i>B. warmboldiae</i>	V	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Cit: citrato de Simmons, PHE: fenilalanina desaminasa, LIS: lisina descarboxilasa, ARG: arginina dihidrolasa, ORN: ornitina descarboxilasa, MAL: utilización del malonato, ADO: adonitol, LAC, lactosa, MEL: melibiosa, RAF: rafinosa, SBL: D-sorbitol.

+: más del 90% de los aislamientos positivos; v: entre el 10 y el 90% de los aislamientos positivos; - : menos del 10% de los aislamientos positivos.

Cedecea

Aspectos taxonómicos

Se le dio el nombre de *Cedecea* a un género conformado por bacterias previamente incluidas en el Grupo Entérico 15 dentro de la familia *Enterobacteriaceae*. El género fue propuesto en 1980. El género *Cedecea* originalmente estaba conformado por dos especies: *Cedeceadavisae* y *Cedecealapagei*. Actualmente son seis especies: *C. davisae*, *C. lapagei*, *Cedecea neteri* y tres especies innominadas conocidas como *Cedecea* especie 3, especie 5 y especie 6. El nombre del género fue obtenido de las siglas de los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ⁸⁰.

Habitat

Su principal reservorio es el medio ambiente, incluido el medio acuático, los peces, el interior de insectos y el intestino de animales. Puede encontrarse sobre hortalizas de hojas verdes y en la superficie de huevos de gallina. Se la encuentra también asociada al medio agrícola en particular con maíz y sorgo: más del 50 % del polvo generado por la agricultura pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y un 0,7 % al género *Cedecea* ^{80, 96}.

Características microbiológicas

Es un bacilo gram negativo móvil por flagelos peritricos, no forma esporas y no presenta capsula⁸⁰.

El género *Cedecea* es fenotípicamente distinto al de otros géneros de la familia *Enterobacteriaceae*. Estas bacterias crecen en agar nutritivo a 37°C formando colonias convexas de alrededor de 1,5 mm de diámetro^{80, 61, 150}.

Pueden desarrollar 15°C y 20°C además de a 37 °C, a pH entre 7 y 9 en caldo tripteína de soja y en agua peptonada con 0, 2 y 4% de NaCl^{80, 61, 150}.

Pruebas bioquímicas y serológicas

El género *Cedecea* comparte reacciones bioquímicas similares al género *Serratia*: es resistente a colistina y cefalotina y da positiva la prueba de lipasa⁸⁰. Es anaerobio facultativo, no fermenta la lactosa la rafinosa ni la melibiosa, no descarboxila la lisina y reduce los nitratos. A diferencia del género *Serratia* no hidroliza el ADN ni la gelatina. La reacción de Voges-Proskauer es positiva, no produce H₂S ni desdobla la urea. Produce gas a partir de la fermentación de la glucosa e hidroliza la esculina. Produce ácido a partir de la fermentación de D-arabitol, D-celobiosa, maltosa, D-manitol, manosa, salicina y trehalosa pero no de adonitol, L-arabinosa ni dulcitol⁸⁰.

Las pruebas diferenciales respecto de los géneros *Enterobacter* y *Serratia* pueden verse en la tabla 2.

A nivel de especie pueden diferenciarse entre sí mediante la prueba de la ornitina descarboxilasa y la fermentación de diversos azúcares (Tabla 3).

Importancia clínica

Ninguno de los 17 aislamientos de *Cedecea* originalmente descritos provenía de sangre o de líquido cefalorraquídeo, por lo que se puso en duda su rol en patología humana. Actualmente son considerados como patógenos oportunistas pero muy infrecuentes⁸⁰.

Se han encontrado en las vías respiratorias superiores y en pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica¹¹⁵. También fueron aislados en infecciones de tejidos blandos, como úlceras^{45, 127}, abscesos y heridas, además de infecciones oftálmicas y bacteriemias. En general afectan a pacientes inmunocomprometidos^{1, 7, 12, 115}.

Tabla 2. Pruebas diferenciales entre los géneros *Cedecea*, *Enterobacter* y *Serratia*.

Prueba	<i>Cedecea</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Serratia</i>
Lactosa	+	+	-
Lipasa	+	-	+
Arginina dihidrolasa	-	+	+/-
Ornitina descarboxilasa	v	+	+
Citrato	-	+	+
Gelatina	-	-	+

DNasa	-	-	+
Ureasa	-	-	-
Indol	-	-	-
Sorbitol	v	+	+

Cedecea davisae ha sido aislada en cultivos de vesícula biliar, quemaduras, infecciones oculares, líquido cefalorraquídeo, esputos en pacientes añosos con enfermedad obstructiva crónica⁹² y bacteriemia en pacientes neutropénicos con leucemia mieloide aguda¹⁴⁸. Se la considera como un agente probable de rinitis atrófica¹⁵ y podría tener un rol como patógeno en las infecciones pulmonares polimicrobianas de pacientes con fibrosis quística⁹⁶.

Tabla 3: Pruebas bioquímicas diferenciales entre especies de *Cedecea*.

Prueba	Reacción ¹ a:				
	<i>C.davisae</i>	<i>C. lapagei</i>	<i>C.neteri</i>	<i>Cedecea</i> especie 3	<i>Cedecea</i> especie 5
Ornitina	+	-	-	-	v
Sacarosa	+	-	+	v	+
D-sorbitol	-	-	+	-	+
Rafinosa	-	-	-	+	+
D-xilosa	+	-	+	+	+
Melibiosa	-	-	-	+	+
Malonato	+	+	+	-	-
Crecimiento en medio sin tiamina	-	+	+	+	+

¹ +,90% a 100% (todos los datos son para 48 horas y 36°C);- 0 a 10% positivo; v 26 a 74% positivo

Cedecea lapagei también fue descrita en casos de bacteriemia e infecciones de piel y tejidos blandos especialmente en pacientes con condiciones predisponentes¹⁶⁰. Fue documentada como el agente causal de una bacteriemia posterior a una lesión por quemadura química y de casos de peritonitis^{43, 49}.

Cedecea neteri fue descrita originalmente a partir de una bacteriemia en un paciente con posible endocarditis⁶¹ y en otra bacteriemia en un paciente con lupus eritematoso sistémico⁵.

Sensibilidad a los antibióticos

Las 17 cepas estudiadas por Grimont et al. fueron sensibles a carbenicilina, tobramicina, gentamicina, amicacina, cloranfenicol, tetraciclina, minociclina, ácido nalidíxico y nitrofurantoína. Todas presentaron resistencia a ampicilina, cefalotina, colistina y polimixina B (excepto una cepa de *Cedecea davisae* que fue sensible a estos dos últimos⁸⁰). Cinco aislamientos de *Cedecea* spp. fueron estudiados por Stone et al. La sensibilidad obtenida sugiere la presencia de una cefalosporinasa con menor actividad sobre ampicilina (encontraron un aislamiento sensible y otro con sensibilidad intermedia). En todos los casos se registró resistencia a cefazolina y cefoxitina y excepto un caso con sensibilidad intermedia a cefotaxima, mostraron sensibilidad a cefalosporinas de tercera generación y a piperacilina-tazobactama¹⁷³.

Se ha descrito un caso de resistencia a carbapenemes en un aislamiento de *C. davisae* proveniente de un urocultivo debido a la expresión combinada de una β -lactamasa de tipo Amp C y la deficiencia de porinas¹⁰.

Ewingella

Características microbiológicas

Son bacilos gram negativos móviles por flagelos peritricos. Miden 0,6 – 0,7 µm de ancho por 1 - 1,8 µm de largo. Crecen en agar nutritivo y en agar sangre como colonias no pigmentadas, más rápidamente a 25°C que a 36°C.

Dan positivas las pruebas de rojo de metilo, Voges Proskauer, ONPG y citrato. No producen gas de glucosa, ni H₂S del TSI. Dan negativas las pruebas de indol, ureasa, DNasa, fenilalanina, lisina, arginina y ornitina.

Aspectos taxonómicos, hábitat e importancia clínica

Grimont et al. en 1983 describió la, hasta ahora, única especie del género: *Ewingella americana*⁸¹.

Está distribuida ampliamente en la naturaleza. Se la aísla de suelo, agua y a partir de animales y vegetales. Es un reconocido patógeno de hongos cultivables pero también un patógeno humano oportunista y una causa poco frecuente de infecciones hospitalarias²⁴.

Se la ha encontrado colonizando el tracto respiratorio y heridas¹⁶ y originando casos de pseudobacteriemia^{36, 129, 130}. Se la ha identificado como probable agente causal de conjuntivitis en personas previamente sanas^{42, 86, 121},

en infecciones respiratorias bajas^{27, 153, 159}, en casos de bacteriemia^{54, 119, 151, 152, 182} y en peritonitis en pacientes sometidos a diálisis peritoneal continua ambulatoria¹⁰⁷.

Sensibilidad a los antibióticos

Parecería ser naturalmente resistente a penicilina (no a ampicilina) y cefalotina. Se han reportado aislamientos multirresistentes, solo sensibles a TMS, ticarcilina-ácido clavulánico y cefotetán¹⁵³.

Cinco aislamientos fueron estudiados por microdilución y todos ellos fueron sensibles a la ampicilina, cefoxitina, cefalosporinas de tercera generación, y piperacilina-tazobactama. Tres de ellos presentaron resistencia o sensibilidad disminuida a la cefazolina.

Hafnia

Aspectos taxonómicos

El género *Hafnia* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y fue descrito por primera vez en 1954. El nombre de la especie *Hafnia alvei* proviene del latín “*alveus*” que significa colmena^{101, 135}.

En alguna oportunidad se la incluyó dentro del género *Enterobacter* y se la denominó *Enterobacter hafniae*.

Originalmente se describieron dos grupos heterogéneos a nivel de ADN (genomoespecies) muy difíciles de distinguir por pruebas bioquímicas (ver más adelante). Sin embargo pueden diferenciarse mediante secuenciación del ARN 16S. Con esta técnica se renombró a *Hafnia alvei* ADN grupo 2 como *Hafnia paralvei*⁹⁵.

Características microbiológicas

En el microscopio se ve como cualquier bacilo gram negativo de la familia *Enterobacteriaceae* (mide 1 – 2 µm de ancho x 5 µm de largo). No presenta esporos y es móvil a 22-30°C por flagelos peritricos¹⁰¹.

Características culturales

Crece en presencia de 2- 5% de NaCl, a pH entre 4,9 y 8,25 y en un amplio rango de temperaturas (4 - 44°C). Su temperatura óptima de crecimiento es 35°C. Desarrolla en medio MacConkey, agar Hektoen, agar SS, EMB y CLDE. También puede crecer en agar MacConkey sorbitol¹⁰¹.

En agar no selectivo produce colonias grandes, lisas, convexas, traslúcidas de 2 -3 mm de diámetro. Algunas de ellas pueden tener borde irregular¹⁰¹.

Como medio de enriquecimiento suele utilizarse caldo selenito o caldo tetrationato, pero no todas las cepas crecen bien¹⁰¹.

Para muestras ambientales y de alimentos pueden utilizarse agar para coliformes fecales y *violet red bile lactose agar* (Oxoid Ltd., UK)¹⁰¹.

Pruebas bioquímicas y serológicas

H. alvei es un anaerobio facultativo y da negativa la prueba de oxidasa. Reduce los nitratos, es indol negativo, lisina y ornitina positivas, arginina negativa y no produce H₂S del TSI. Fermenta la glucosa, la arabinosa y la ramnosa, pero no fermenta la lactosa, la rafinosa, el D-sorbitol, el inositol ni el adonitol. Da positiva la reacción de Voges Proskauer, pero a 22°C las cepas producen más cantidad de acetil-metil-carbinol que a 35°C^{101, 135}.

El género *Hafnia* puede ser confundido con *E. coli* y *Yokenella regensburgei*. Para diferenciarla de estos géneros se utilizan las pruebas de Voges Proskauer y la fermentación de glicerol (ambas pruebas positivas para *Hafnia*) y la producción de ácido de melibiosa (negativa para *Hafnia*)¹⁰¹. Las pruebas positivas de KCN, Voges-Proskauer y glicerol y la negativa de glutamato descarboxilasa la diferencian de *Escherichia albertii*.

Si bien *H. alvei* y *H. paralvei* son muy difíciles de separar por pruebas bioquímicas, la utilización del malonato (leída a las 48 horas), la fermentación de D-arabinosa y salicina (a las 96 horas) y la prueba de β-glucosidasa resultan orientadoras (Tabla 4). No obstante la secuenciación de la subunidad 16S del ARN ribosomal es el método de elección¹⁰⁰.

Tabla 4. Caracteres fenotípicos útiles para distinguir ente *H. alvei* y *H. paralvei*

Prueba	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia paralvei</i>
Malonato	+ / (+)	-
D-arabinosa	(+) / -	+ / (+)
Salicina	+/-	-
β-glucosidasa	+ / (+)	-

^a+ reacción intensa a las 24 h; (+) reacción débil o retardada; – negativa.

La inmunoquímica del lipopolisacárido de *Hafnia* es extremadamente complicada. Se reconocieron 68 tipos de antígenos somáticos O y 34 tipos de antígenos flagelares H. Algunas cepas de *Hafnia alvei* pueden aglutinar con el antisuero O:157¹⁰¹.

Hábitat, epidemiología e importancia clínica

Puede encontrarse en agua, suelos y alimentos como carne de vaca, cerdo, quesos y miel. Los vegetales no parecen ser un reservorio frecuente de este microorganismo. Forma parte de la microbiota habitual de mamíferos, aves, reptiles, insectos y peces. El tracto gastrointestinal de los animales y en particular el de los mamíferos es un hábitat muy común para las bacterias de este género^{101, 135}.

Es un patógeno humano poco frecuente. En general se aísla en pacientes con cáncer, cirugía, trauma, enfermedad pulmonar aguda o crónica,

cirrosis, hepatitis y pancreatitis. Se recuperó *Hafnia* de muestras de orofaringe y tracto gastrointestinal y menos frecuentemente de orina, tejidos y catéteres¹⁰¹. Luego del tracto gastrointestinal la fuente más frecuente de aislamientos es el respiratorio: esputo, aspirados traqueales y bronquiales, boca y garganta, la mayoría de los aislamientos no son clínicamente significativos¹⁰¹.

Se estudiaron 68 aislamientos clínicos obtenidos desde 1970 hasta 2011. 39 habían sido aislados del tracto gastrointestinal, 5 del tracto respiratorio, 3 de orina, 1 de herida y 20 de sitios desconocidos⁴.

Infecciones asociadas

Durante mucho tiempo se asoció a esta bacteria con casos de gastroenteritis pero son pocos los datos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio que avalan esta hipótesis¹⁰¹. Su rol en la gastroenteritis es controvertido debido a que si bien algunas cepas poseen el gen *eae* de virulencia todos los aislamientos gastrointestinales fueron obtenidos junto a otros enteropatógenos¹⁰¹.

Se han descrito brotes de enfermedades asociadas a la industria avícola y en otro tipo de infecciones animales como neumonía en cabras, abortos en caballos y sepsis en conejos¹⁰¹.

Se comporta como un patógeno oportunista. Puede causar infecciones nosocomiales incluyendo bacteriemia, neumonía, infección de herida quirúrgica, endoftalmitis y absceso glúteo, favorecidas por procedimientos

invasivos⁵. El foco de las bacteriemias por *Hafnia alvei* podría ser gastrointestinal o del tracto respiratorio. Puede causar bacteriemia, pielonefritis y neumonía en pacientes trasplantados renales¹⁶⁸.

Moreno et al. describieron cuatro casos de bacteriemia en una unidad cardio quirúrgica pediátrica debidos a *Hafnia alvei*. Todos los pacientes presentaron factores de riesgo tales como presencia de catéteres, cirugía cardíaca y hospitalización prolongada. En solo dos de los casos se identificó la fuente de la bacteriemia como el catéter venoso central¹³³.

También se describió un caso asociado al síndrome urémico hemolítico y otros relacionados a trasplantes^{20, 28, 41, 162}.

Factores de virulencia

Las cepas de *Hafnia* producen: sideróforos, hemaglutininas manosa sensibles y manosa resistentes (MR/K fimbria tipo 3). No poseen elastasas, hemolisinas, proteasas ni lecitinasas, que sí se encuentran en otras bacterias patógenas¹⁰¹.

Abbott et al. encontraron que un alto porcentaje de aislamientos de *H. alvei* eran capaces de desarrollar efecto citopático sobre células Vero. Incluso se las ha asociado con infecciones gastrointestinales y sus secuelas⁴.

Sensibilidad a los antibióticos

Independientemente de la especie son uniformemente sensibles a ampicilina, gentamicina, fluoroquinolonas, TMS, cefepima y carbapenemes.

Son resistentes a penicilina, oxacilina, amoxicilina y amoxicilina-ácido clavulánico. Son sensibles a carbapenemes, monobactams, aminoglucósidos, quinolonas y trimetoprima sulfametoxazol. La sensibilidad a tetraciclinas, cloranfenicol y cefalosporinas es variable.

Poseen en su cromosoma una enzima de tipo AmpC¹⁰¹. Algunas cepas de *Hafnia alvei* producen bajos niveles de esta cefalosporinasa cromosómica inducible, pero pueden aumentar la cantidad de enzima producida, y de esta manera se puede afectar la actividad de las cefalosporinas de tercera generación^{101, 134, 135, 168, 169}.

Aproximadamente un 25% de los aislamientos presentan resistencia a colistina por difusión⁸².

Skurnik et al.¹⁶⁸ reportaron resistencia a carbapenemes por pérdida de la proteína de membrana OmpK36. Dicha proteína es justamente la que regula la permeabilidad a los carbapenemes.

***Kluyvera* spp.**

Aspectos taxonómicos

Las bacterias del género *Kluyvera* son bacilos gram negativos móviles pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* que fueron definidos en 1936 por Kluyver y van Niel¹⁰⁹. Su ubicación taxonómica fue confirmada por métodos moleculares en 1981⁶².

El género tiene cuatro especies: *Kluyvera cryocrescens*, *Kluyvera ascorbata*, *Kluyvera georgiana* y *Kluyvera cochleae*, de las cuales solo las tres primeras se han aislado en humanos^{31, 161}.

Habitat

Se encuentra en el medio ambiente como un microorganismo de vida libre: en agua, suelos y aguas residuales, también en sumideros de hospitales y productos comestibles de origen animal.

Forma parte de la microbiota habitual del tracto digestivo humano pero por lo general se encuentra en bajas concentraciones¹⁶¹.

Características microbiológicas

Kluyvera crece bien en todos los medios de cultivo comunes. Las colonias son semejantes a las del género *Escherichia*.

Las bacterias del género *Kluyvera* son oxidasa negativas, móviles, catalasa positivas y reducen los nitratos a nitritos. Fermentan la glucosa y otros carbohidratos con formación de ácido y generalmente gas produciendo grandes cantidades de ácido α -cetoglutarico. Producen indol y dan negativa la reacción de Voges Proskauer. Descarboxilan la ornitina y la lisina y pueden utilizar el malonato y el citrato. Dan positiva la prueba de larafinosa^{62, 113}. Estas pruebas las diferencian de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Tabla 5). *K.*

ascorbata y *K. cryocrescens* pueden separarse por medio de unas pocas pruebas (Tabla 6). No obstante es necesario apelar a métodos moleculares para lograr una correcta identificación a nivel de especie.

Epidemiología e importancia clínica

Su aislamiento en infecciones clínicas es raro. Se desconoce si las infecciones por *Kluyvera* son predominantemente de origen endógeno, son adquiridas a través del medio ambiente o si ambas rutas son igualmente frecuentes.

Todas las especies han sido aisladas de muestras clínicas excepto *Kluyvera cochleae* que solo fue aislada de caracoles y babosas.

No se han descrito factores específicos de virulencia pero, a semejanza de otras enterobacterias.*Kluyvera* posee el lipopolisacárido de la pared y antígenos de superficie que le confieren poder patógeno.

Puede causar infecciones graves, incluso en individuos inmunocompetentes y se han reportado muertes atribuidas a este microorganismo.

Tabla 5: Diferenciación de *Kluyvera* spp. de otras especies de enterobacterias indol positivas y Voges Proskauer negativas

Prueba	Especie					
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Kluyvera</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>
Citrato de Simmons	- ^a	+	+	+	+	+

Lisina descarboxilasa	+/-	-	-	+/-	-	-
Arginina dihidrolasa	-	-	-/+	-	-	-
Ornitina descarboxilasa	v	+	+	+	-	-
Malonato	-	+	-	+	+/-	v
Pigmento amarillo	-	-	-	-	-	+/-
β-glucuronidasa	+	-	-	-	-	-
Gas de D-glucosa	+/-	+	+	+/-	+	-
Lactosa	+	-	-	+	v	-
Adonitol	-	+	-	-	-	-
L-sorbosa	-/+	-	+	-	-	-
Sacarosa	v	v	-	+	-	-
Salicina	v	-	-	+	v	v
Rafinosa	-/+	-	-	+/-	-	-
Melibiosa	+/-	-	-	+	+	v

+^a: 90 -100% positivo. +/- 75-89% positivo. V: 26-74 % positivo. -: 11- 25% negativo. - /+ 0-10 %negativo

Tabla 6: Diferenciación bioquímica de *K. ascorbata* y *K. cryocrescens*^a

Prueba	<i>K. ascorbata</i>		<i>K. cryocrescens</i>	
Ascorbato	+ ^b	97% ^b	-	0%
Ácido de D-glucosa (5°C, 21d)	-	3%	+	100%
Lisina descarboxilasa	+	100%	v	50%

Gas de D-glucosa	+/-	86%	v	50%
Dulcitol	v	45%	-	0%

^a: tabla basada sobre 29 cepas de *K. ascorbata* y 10 cepas de *K. cryocrescens*

^b: a 36°C durante 48h. +:90-100% positivas ; . +/- :75-89% positivas; v:26-74% positivas; - : 0-10% positivas

Tienen la capacidad de invadir múltiples órganos y tienen una tendencia a formar abscesos¹⁶¹.

Se describieron dos series de casos de bacteriemia nosocomial por *Kluyvera* sp., uno de ellos fue un brote asociado a heparina contaminada en pacientes con cardiopatía isquémica¹¹³ y otro se dio en cuatro pacientes hospitalizados cuya evolución fue satisfactoria sin necesidad de tratamiento antibiótico¹⁸.

Se han descrito infecciones de piel y tejidos blandos en adultos^{117, 185} y una mediastinitis posterior a una operación cardíaca¹¹⁸. Se han comunicado tres casos de colecistitis, uno de pancreatitis aguda y una bacteriemia por *K. ascorbata* secundaria a una colangitis aguda de origen litiásico^{14,116,144}. También se aisló *Kluyvera cryocrescens* en un líquido de diálisis peritoneal en una paciente adulta con peritonitis¹⁶³.

En pediatría se han documentado desde infecciones urinarias a sepsis^{97, 139, 179}. Se describió un caso de una bacteriemia asociada a catéter de Broviac por *Kluyvera cryocrescens* en un niño de 17 meses de edad con un falla cardíaca congénita¹⁸⁸ y bacteriemias en neonatos^{9, 165}. En 1990 se publicó un caso fatal de peritonitis¹⁹⁰ y recientemente se describieron 4 infecciones diversas (sepsis, bacteriemia asociada a catéter, pielonefritis y colección intraabdominal) en niños de 6 meses a 17 años¹⁰⁶.

Sensibilidad a los antibióticos

El número de cepas estudiadas es pequeño debido a la escasa frecuencia con que estos microorganismos se aíslan de materiales clínicos humanos.

Los agentes más activos frente a *Kluyvera* spp. son las cefalosporinas de tercera generación, las fluoroquinolonas, los aminoglucósidos, el imipenem, el cloranfenicol y los nitrofuranos. Los antimicrobianos con actividad variable son piperacilina, ampicilina-sulbactama, tetraciclinas y trimetoprima sulfametoxazol^{18, 97}. La ampicilina, las cefalosporinas de primera y segunda generación, así como también la ticarcilina tienen una escasa actividad sobre *Kluyvera* spp. debido a la producción cromosómica de una β -lactamasa KLUA-1. Se ha descrito la capacidad de *K. ascorbata* para transferir los genes codificadores de esta β -lactamasa a *E. coli*, a través de plásmidos. En *E. coli* esta enzima se manifiesta como una β -lactamasa de espectro extendido (tipo CTX-M)^{94, 158}.

Moonah et al. comunicaron un caso de sepsis por *K. ascorbata* mutirresistente (solo sensible a ampicilina, tobramicina e imipenem) en un adulto¹³² y en Brasil se describió un aislamiento de *K. georgiana* resistente a carbapenemes, portadora de KPC-2, en una muestra de secreción respiratoria de un paciente intubado¹⁵⁵.

Leclercia

Aspectos taxonómicos, hábitat e importancia clínica

Originalmente denominada *Escherichia adecarboxyata* por Leclerc en 1962 e incluida en el Grupo Entérico 41, *Leclercia adecarboxylata* es la única especie del género¹⁷⁵.

Está ampliamente distribuida en la naturaleza, sin embargo solo esporádicamente se la aísla a partir de materiales clínicos¹⁵⁶. Su presencia en el intestino humano no implica producción de diarrea u otros cuadros gastrointestinales. Principalmente se la ha aislado de infecciones en pacientes inmunocomprometidos y a veces como parte de flora mixta.

Se la ha aislado de artritis séptica en pacientes inmunocompetentes^{83, 149}, en un caso de peritonitis espontánea y en pacientes sometidos a diálisis peritoneal^{33, 64, 108, 157}. Se han descrito dos casos de sepsis neonatal^{138, 140}, un caso de endocarditis¹²² y bacteriemias de diverso origen^{47, 48, 50, 51, 70, 114, 128, 178}.

También se la aisló en pacientes con infecciones relacionadas a catéteres periféricos, centrales y de diálisis, tanto en individuos inmunocomprometidos como en normoinmunes^{53, 65, 122, 124, 166}, en quemados⁴⁶, en un caso de colecistitis¹⁰⁵, en infecciones de piel y tejidos blandos^{19, 38, 87, 125, 131, 164, 174, 178} y en infecciones respiratorias bajas^{57, 178} y altas¹³.

Características microbiológicas

Son bacilos gram negativos móviles a 25-36°C. Forman colonias amarillentas y desarrollan en medios comunes para enterobacterias. Su temperatura óptima de crecimiento está entre los 30°C y los 37°C.

Dan positivas las pruebas de indol, rojo de metilo y ONPG. Además de glucosa (con producción de gas), fermentan la lactosa y otros azúcares. Dan negativas las pruebas de Voges Proskauer, lisina, arginina, ornitina, fenilalanina y DNasa. No producen H₂S en el TSI.

Sensibilidad a los antibióticos

Resistencia natural

Leclercia adecarboxylata presenta resistencia natural solo a los antibióticos a los cuales son resistentes las enterobacterias: oxacilina, bencilpenicilina, macrólidos, cetólidos, lincosamidas, dalfopristina-quinupristina, ácido fusídico, glucopéptidos, oxazolidinonas y rifampicina¹⁷⁰.

Resistencia adquirida

Pocos aislamientos multirresistentes fueron descritos en esta especie. En primer lugar se aisló una cepa resistente a cefalosporinas de tercera generación y al aztreonam, portadora de una β-lactamasa de espectro extendido de tipo SHV (SHV-12)¹²⁸.

En un caso de bacteriemia se aisló *L. adecarboxylata* resistente a sulfamidas, aminoglucósidos, aztreonam y cefalosporinas de tercera generación. La cepa era portadora de los genes *bla(TEM-1)*, *bla(CTX-M1)* e *intl1* (*dfrA12-orfF-aadA2*) como determinantes genéticos de resistencia¹⁶⁶.

En un aislado no clínico se determinó la presencia de una metalo- β -lactamasa VIM-1 que le confirió resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación y sensibilidad disminuida a meropenem y piperacilina-tazobactama¹⁴⁵.

Leminorella

Aspectos taxonómicos, hábitat e importancia clínica

Son solo dos especies (*Leminorella grimontii* y *Leminorella richardii*) descritas por Hickman – Brenner et al. en 1985⁸⁹. Anteriormente pertenecían al Grupo Entérico 57.

Se las aísla de agua, suelo y materiales clínicos humanos, especialmente orina y materia fecal²⁴.

Se ha discutido su importancia en clínica humana, pero se describió un caso de peritonitis espontánea por *L. grimontii* en un paciente cirrótico de 63 años⁴⁴.

Características microbiológicas

Son bacilos gram negativos rectos no móviles. Crecen en agar MacConkey, agar nutritivo y en agar sangre como colonias no pigmentadas; su temperatura óptima de desarrollo, es de 30 - 36°C.

Fermentan lentamente la D-glucosa (a las 48 h) y producen H₂S del TSI. Dan negativas las pruebas de Voges Proskauer, ONPG, indol, ureasa, DNasa, fenilalanina, lisina, arginina y ornitina.

Las dos especies: *Leminorella grimontii* y *Leminorella richardii* se diferencian por las pruebas de rojo de metilo, dulcitol y citrato, que son negativas para la primera.

Sensibilidad a los antibióticos

Parecen ser naturalmente resistentes a estreptomicina, penicilina, ampicilina, carbenicilina y cefalotina⁸⁹. Algunas cepas adquirieron β-lactamasas de espectro extendido³.

Photorhabdus

Aspectos taxonómicos, hábitat e importancia clínica

Las bacterias del género *Photorhabdus*, al igual que las de su género relacionado *Xenorhabdus*, se encuentran principalmente asociadas con

nematodos como simbioses. Se las ha utilizado en el control de insectos por su capacidad larvica⁷¹.

Originalmente su especie tipo *Photorhabdus luminescens* formaba parte del género *Xenorhabdus* como *Xenorhabdus luminescens*. Actualmente se reconocen tres especies: *Photorhabdus luminescens*, *Photorhabdus temperata* y *Photorhabdus asymbiotica*. Esta última es la única capaz de producir infecciones en el hombre⁶⁹. En ella se reconocen dos subespecies: *Photorhabdus asymbiotica* subsp. *asymbiotica* y *Photorhabdus asymbiotica* subsp. *australis*⁶.

Los primeros 6 aislamientos clínicos humanos fueron estudiados por los CDC de Atlanta, EE.UU. en 1989⁶³. Posteriormente, entre 1994 y 1998 se informaron 4 casos de infecciones en Australia¹⁴⁷. Todos ellos se identificaron incorrectamente como *Xenorhabdus luminescens* o como *Photorhabdus luminescens*⁶.

Estos microorganismos han sido aislados principalmente en casos de bacteriemia e infecciones de piel y tejidos blandos. La mayor parte de los pacientes efectuaba actividades al aire libre, especialmente durante los días húmedos y calurosos del verano. Algunos de ellos eran diabéticos^{76, 78, 147, 184}.

Los genes responsables de la patogenicidad en insectos y en el hombre, en el caso de *Photorhabdus asymbiotica* están codificados en el mismo genoma y podrían tratarse de factores de virulencia igualmente apropiados para insectos como para seres humanos¹⁸³.

El ciclo de vida de las bacterias del género *Photorhabdus* es complejo. Se asocia con una gran variedad de sustratos biológicos y hospederos: nematodos del género *Heterorhabditis*, una amplia variedad de insectos y los

seres humanos, en el caso de *P. asymbiotica*. En esta instancia no nos vamos a referir a las interacciones con invertebrados, las cuales han sido motivo de varias publicaciones^{34, 35, 56, 66, 67, 68, 72, 77, 84, 187}.

Además de su ciclo de vida en nematodos e insectos, *P. asymbiotica*, como ya se mencionó es agente etiológico de infecciones humanas conocidas como fotorrabdosis. Este tipo de infecciones se caracterizan por tratarse de lesiones cutáneas seriamente ulceradas, tanto en el sitio inicial como en localizaciones distales, producto de su diseminación. Algunos casos requirieron tratamientos antibióticos intensivos, a pesar de los cuales, a veces recidivaron^{76, 78, 184}.

Características microbiológicas

Son bacilos gram negativos móviles por flagelos peritricos. Sus dimensiones son 2-6 µm de largo por 0,5–1,4 µm de ancho. Su temperatura óptima de crecimiento es de 28°C, aunque *P. asymbiotica* crece muy bien a 36°C y puede hacerlo incluso hasta en una atmósfera de 40°C.

Probablemente muchos casos de fotorrabdosis fueron mal diagnosticados debido a que los métodos automatizados y miniaturizados sistemáticamente han fallado en su identificación. En un trabajo específicamente se resalta la necesidad de contar con especialistas en Microbiología para poder orientar la identificación de estos microorganismos¹⁸⁴.

Prestando atención al desarrollo en agar sangre, donde *P. asymbiotica* produce *swarming*, un pigmento amarillo amarronado y un anillo de hemólisis característico, alejado unos 10 mm de la colonia, puede tenerse una primera

impresión de que se trata de un bacilo gram negativo poco común. Si se realizan pruebas bioquímicas clásicas como oxidasa (negativa), catalasa (positiva), TSI, donde se observa fermentación de la glucosa y reducción de nitratos (negativa, a pesar de ser una enterobacteria), se confirma la sospecha de *Photorhabdus*. La bioluminiscencia es una prueba que no siempre puede observarse a ojo desnudo aún utilizando lámparas adecuadas en una habitación oscura. No obstante resulta consistente si se determina a través de un contador de centelleo. Esta propiedad es única entre las enterobacterias de hábitat terrestre.

Las pruebas de indol, rojo de metilo, Voges Proskauer, fenilalanina, lisina, ornitina y arginina son negativas. No produce H_2S del TSI, puede utilizar el citrato y el acetato, da positiva la prueba de gelatinasa a los 2 días y la de DNasa a los 5 (solo *P. asymbiotica* subsp. *australis*). La subespecie *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* da positiva la prueba de esculina a diferencia de la otra subespecie.

Los métodos moleculares resultan esenciales para la documentación de género y especie. Se ha comprobado la gran diferencia entre el genoma de *P. asymbiotica* y el de las otras especies de *Photorhabdus* no patógenas para el hombre¹⁸⁰.

Patogenia

Photorhabdus asymbiotica, produce patología en el hombre y en los insectos a través de mecanismos no del todo conocidos. Se ha observado que

es un patógeno intracelular facultativo que puede replicarse en el interior de los macrófagos humanos⁴⁰.

Comparando bacterias de los EE.UU. y Australia, se vio que solo estas últimas eran capaces de invadir células no fagocíticas. Una de las principales diferencias entre esas cepas era la presencia de un plásmido (pPAA3) similar al pCRY de *Yersinia pestis*. Esto podría explicar el mayor grado de virulencia observado con las cepas australianas tanto en cultivos de tejidos como en las infecciones humanas¹⁸⁶.

P. asymbiotica presenta una citotoxina (PaTox) que explica en parte su actividad en cultivos de tejidos e *in vivo*¹⁰³.

Sensibilidad a los antibióticos

Los pocos aislamientos estudiados parecen presentar una resistencia natural a la ampicilina y a las cefalosporinas de primera generación. Habitualmente son sensibles a fluoroquinolonas, tetraciclinas y aminoglucósidos¹⁸⁴.

Rahnella

Aspectos taxonómicos y características microbiológicas

Rahnella aquatilis, la especie tipo de este género, fue descrita en 1981 por Izard et al.⁹⁸.

En la literatura se mencionan tres genomoespecies que no pueden ser diferenciadas por pruebas bioquímicas y que se denominan *Rahnella aquatilis* genomoespecies 2 y 3²⁶.

Son bacilos gram negativos de 0,5 – 0,7 µm de ancho por 2 – 3 µm de largo. A veces presentan movilidad a 25°C. Las colonias no son pigmentadas y su temperatura óptima de crecimiento está entre los 30 y los 37°C. Son psicrotolerantes ya que desarrollan lentamente a 4°C. Crecen bien en agar nutritivo, agar tripteína de soja y agar sangre.

En su identificación por pruebas bioquímicas suele confundirse con *Pantoea (Enterobacter) agglomerans*. Da positivas las pruebas de ONPG, fenilalanina (en 48 horas), rojo de metilo, Voges Proskauer y citrato. Las pruebas de indol, ornitina, lisina, arginina, ureasa y DNasa son negativas. En el TSI no produce H₂S y se manifiesta como no fermentadora de lactosa²⁵.

Habitat e importancia clínica

Rahnella aquatilis es una bacteria que se puede encontrar en el agua, en suelos, vegetales, heces humanas y de animales y en alimentos (carne, pescado, lácteos)¹⁷¹.

Se la ha aislado de pacientes con bacteriemia de diverso origen, en algunos casos graves, especialmente en pacientes inmunodeprimidos, pero también en inmunocompetentes^{29, 30, 32, 74, 79, 142, 177}.

Se describieron infecciones relacionadas a catéteres^{75, 93} y también un caso de endocarditis infecciosa en una niña de 11 meses portadora de una cardiopatía congénita¹²⁶.

Se la aisló de secreciones respiratorias y de materia fecal en dos niños con gastroenteritis^{58, 85, 154}. Fue descrita como responsable de una infección urinaria en un paciente trasplantado renal y de una infección de herida quirúrgica^{8, 120}.

Sensibilidad a los antibióticos

Parece tener resistencia natural a ampicilina, cefalosporinas de primera y segunda generación, cefoxitina, amoxicilina-ácido clavulánico y fosfomicina^{120, 143}.

Se estudiaron 72 aislamientos clínicos y ambientales de *R. aquatilis*. Se vio que además de su resistencia a amoxicilina, ticarcilina, cefuroxima y cefalotina, también mostraban una sensibilidad intermedia a cefotaxima y ceftriaxona, pero no a ceftazidima e imipenem¹⁷¹.

En concordancia con estos resultados fenotípicos se descubrió la presencia de una β -lactamasa cromosómica no inducible de clase A de Ambler a la que se denominó RAHN-1, con un pI de 7, 2 y una identidad de aminoácidos del 76, 73, y del 71% con la β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) de *Serratia fonticola* llamada SFO-1 y con las BLEE CTX-M-2 y CTX-M-1, respectivamente. La presencia El ácido clavulánico es capaz de hidrolizar a RAHN-1 y así expandir la sensibilidad a cefalosporinas de segunda y tercera

generación como cefuroxima, cefotaxima y ceftriaxona, pero no a ceftazidima, lo cual coincide con el patrón de las enzimas CTX-M¹⁷. No obstante por microdilución se observaron aislamientos sensibles a la ampicilina (1/5), a ampicilina-sulbactama (5/5), a cefazolina (1/5) y a cefoxitina (5/5)¹⁷³.

Tatumella

Aspectos taxonómicos

El género *Tatumella* pertenecía al Grupo Entérico EF-9 y actualmente comprende seis especies: *Tatumella ptyseos* (la especie tipo), *Tatumellacitrea*, *Tatumellamorbirosei*, *Tatumella punctata* y *Tatumella terrea*. La restante, *Tatumella saanichensis* es una especie recientemente propuesta, aislada de un paciente con fibrosis quística¹⁸¹.

Tatumella ptyseos fue descrita por Hollis et al. en 1981. Luego, en 2010, Brady et al. cambiaron la denominación de *Pantoea citrea*, *Pantoeapunctata* y *Pantoea terrea* por *T. citrea*, *T. punctata* y *T. terrea*. Además, estos investigadores definieron la especie *T. morbirosei*^{23, 91}.

Características microbiológicas

Son bacilos gram negativos de 0,8 – 12 µm de ancho por 1 -3 µm de largo. Las colonias son lisas, redondas y convexas, de un color marrón o

anaranjado pálidos. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, pero no crecen a 42°C.

T. tyseos se diferencia de otras enterobacterias por producirse un gran halo de inhibición alrededor de un disco de penicilina y por su tendencia a no sobrevivir más de una semana en agar sangre^{60,91}. Presenta cierta similitud en las pruebas bioquímicas respecto de *P. agglomerans* y *Chromobacterium violaceum*. Con la primera existe una fuerte homología genética a juzgar por las características observadas tras la secuenciación parcial del gen que codifica el factor de elongación Tu (gen *tuf*) y el gen de la subunidad α de la F_1F_0 -ATPasa (gen *atpD*)¹⁴⁶.

Puede presentar movilidad a 25°C pero no a 36°C. No fermenta la lactosa, pero sí la sacarosa, no produce gas de glucosa ni H₂S en el TSI.

Da negativas las pruebas de indol, Voges Proskauer, citrato a 36°C, ureasa, lisina, arginina, ornitina, ONPG y DNasa. Da positiva la prueba de fenilalanina.

Habitat e importancia clínica

A estas bacterias se las ha encontrado en suelo, agua, carcasas de aves y vegetación^{90, 104, 133, 141, 167}. *T. tyseos* es la única especie de este género que ha sido aislada de muestras clínicas humanas a excepción de la recientemente descrita *Tatumella saanichensis*.

También se publicó el hallazgo de *T. tyseos* en fórmulas lácteas infantiles¹²³.

Hollis et al. describieron 44 aislamientos de *T. pyseos* obtenidos 30 de esputo, 7 de exudados de fauces, 3 de sangre, 1 de aspirado traqueal, 1 de un tubo de alimentación, 1 de materia fecal y 1 de orina⁹¹. Se reportó un caso de sepsis neonatal¹⁷⁶ y otros dos casos de sepsis en adultos³⁹.

Sensibilidad a los antibióticos

Los aislamientos de *T. pyseos* estudiados por Hollis et al., Tan et al. y Stone et al. eran sensibles en alguno de los trabajos en que fueron ensayados a ampicilina, cefalosporinas de primera generación, cloranfenicol, gentamicina, amicacina, tobramicina, kanamicina, trimetoprima-sulfametoxazol y tetraciclina^{91, 176, 173}. También se observó un patrón similar de sensibilidad en los dos aislamientos de Brasil³⁹. Sin embargo, los cuatro aislamientos obtenidos de fórmulas infantiles presentaron un 100% de resistencia a la ampicilina y a trimetoprima-sulfametoxazol¹²³.

Yokenella (Koserella)

Aspectos taxonómicos

Yokenella regensburgei es la única especie del género^{2, 172}. Situada previamente dentro del Grupo Entérico 45, fue denominada *Koserella trabulsii* por los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) de los EE.UU. El nombre actual de género y especie fue tomado de una descripción muy anterior realizada por Kosako et al. en 1984¹¹⁰.

Hábitat e importancia clínica

Yokenella regensburgei fue aislada de agua, alimentos y del tracto intestinal de insectos y de reptiles. Raramente se la describió como implicada en infecciones humanas. En ese contexto se pueden mencionar infecciones de heridas e infecciones urinarias. Se la aisló también del tracto respiratorio, sangre, contenido intestinal y líquido sinovial^{2, 88, 110, 172}. Bioquímicamente se asemeja a *Hafnia* spp. y a *Salmonella enterica*^{88, 110}.

Se han descrito bacteriemias, una en un cuadro similar a una fiebre entérica en un niño de 5 años, otras dos, a punto de partida de infecciones de piel y tejidos blandos pacientes inmunocomprometidos, otra asintomática también en una paciente inmunocomprometida y otra a partir de una artritis séptica^{2, 21, 99, 189}. También fue aislada a partir de infecciones con menor impacto clínico⁵⁹.

Características microbiológicas

Es un bacilo gram negativo móvil a 36°C por flagelos peritricos. Desarrolla en agar sangre o en agar nutritivo entre 27°C y 37°C, pero no lo hace a 4°C. La reacción negativa de Voges Proskauer y las reacciones positivas de citrato, celobiosa, melibiosa y D-arabitol la separan de *Hafnia alvei*.

Da positivas las pruebas de rojo de metilo, lisina y ornitina y produce gas de glucosa. Da negativas las pruebas de indol, ureasa, arginina y fenilalanina, no fermenta la lactosa y no produce H₂S en el TSI.

Sensibilidad a los antibióticos

Stone et al. compararon el método de difusión con discos y el VITEK 2 como métodos de prueba de sensibilidad a los antibióticos para estos bacilos gram negativos infrecuentes (15 géneros y 26 especies que incluían a *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Kluyvera*, *Leminorella* y *Yokenella*). Se utilizó el método de microdilución realizado en el CDC de los EE.UU. como método de referencia. Se incluyeron aminoglucósidos, carbapenemes, cefalosporinas, fluoroquinolonas, penicilinas y trimetoprima-sulfametoxazol. La concordancia fue del 95% aunque menor para ampicilina y cefazolina. Los autores señalaron que los métodos automatizados que requieren identificar a la bacteria para dar los resultados de sensibilidad, pueden fallar por no contemplar a alguna de estas especies poco frecuentes en su base de datos¹⁷³.

En otro estudio se ensayaron 75 antibióticos con 10 cepas de *Y. regensburgei* por microdilución. Todas las cepas resultaron ser resistentes o al menos presentaron sensibilidad intermedia a penicilina G, oxacilina, amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefaclor, cefazolina, cefoxitina, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, cetólidos, ácido fusídico, glucopéptidos, linezolid y rifampicina. Todas ellas presentaron sensibilidad a los aminoglucósidos, cloranfenicol, varios β -lactámicos, inhibidores de la síntesis del folato, fosfomicina, nitrofurantoína, quinolonas y tetraciclinas. En todas las

cepas se determinó la presencia de productos de la amplificación del gen *ampC* y su expresión fue fuertemente inducible¹⁷².

Tabla 7. Pruebas diferenciales entre bacterias de los géneros descritos en este capítulo

Género	Ind	RM	VP	Cit	H ₂ S	Phe	Lys	Arg	Orn	Lac	Sac	DN	ON
<i>Budvicia</i>	-	+	-	-	+/-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>B. agrestis</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>B. garviniae</i>	-	+	-	-/+	-	-	-	-/+	-	v	-	-	+
<i>B. noackiae</i>	-/+	+	-	-/+	-	-	-	+/-	-	-	-	-	+
<i>Cedecea</i>	-	+/-	+	+	-	-	-	+/-	-/+	-/+	+/-	-	+
<i>Ewingella</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+/-	-	-	+/-
<i>Hafnia</i>	-	v	+ ^a	-	-	-	+	-	+/-	-	-	-	+/-
<i>Kluyvera</i>	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>Leclercia</i>	+	+		-	-	-	-	-	-	+	v	-	+
<i>Leminorella</i>	-	v	-	v	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Photorhabdus</i>	-/+	-	-	-/+	-	-	-	-	-	-	-	+ ^b	-
<i>Rahnella</i>	-	+/-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+
<i>Tatumella</i>	-	-	-	-	-	+	+	v	+	-	+	-	-
<i>Yersinia</i>	-/+	+	-	-	-	-	-	-	+/-	-	+/-	-	+
<i>Yokenella</i>	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+

- : más del 90% negativas, +: más del 90% positivas, +/-: entre el 75 y el 90% positivas, -/+ : entre el 75 y el 90% negativas, v: entre el 25 y el 75% positivas, +^a más del 90% positivas a 22°C, +^b positivo a los 5 días de incubación.

Ind: indol; RM: rojo de metilo; VP: Voges Proskauer, Cit: citrato de Simmons, SH₂: producción de ácido sulfhídrico del TSI, Phe: fenilalanina, Lys: lisina, Arg: arginina, Orn: ornitina, Lac: lactosa; Sac: sacarosa; DN: DNasa; ON: ONPG.

B. agrestis, *B. garviniae* y *B. noackiae* pertenecen al género *Buttiauxella*.

Otras enterobacterias

Otras bacterias, de importancia clínica incierta como las de los géneros *Erwinia*, *Pragia*, *Obesumbacterium*, *Traboulsiella* y *Xenorhabdus* escapan a los alcances de este manual.

En la tabla 7, en la que se describen los resultados de las pruebas bioquímicas básicas de los géneros incluidos en este capítulo, no fueron considerados los géneros *Erwinia*, *Pragia*, *Obesumbacterium*, *Traboulsiella* y *Xenorhabdus*.

Bibliografía

1. Abate G, Qureshi S, Mazumder SA. *Cedecea davisae* bacteremia in a neutropenic patient with acute myeloid leukemia. J Infect. 2011; 63:83-5.
2. Abbott SL, Janda JM. Isolation of *Yokenella regensburgei* ("*Koserella trabulsi*") from a patient with transient bacteremia and from a patient with a septic knee. J Clin Microbiol. 1994;32:2854-5.
3. Abbott SL, Lidgard JA, Cheung WK, Obeso MN, Berrada ZL, Janda JM. Expression of ESBL-like activity in infrequently encountered members of the family *Enterobacteriaceae*. Curr Microbiol. 2012;64:222-5.

4. Abbott SL, Moler S, Green N, Tran RK, Wainwright K, Janda JM. Clinical and laboratory diagnostic characteristics and cytotoxigenic potential of *Hafnia alvei* and *Hafnia paralvei* strains. J Clin Microbiol. 2011;49:3122-6.
5. Aguilera A, Pascual J, Loza E, López J, García G, Liaño F, Quereda C, Ortuño J. Bacteraemia with *Cedecea neteri* in a patient with systemic lupus erythematosus. Postgrad Med J. 1995; 71: 179-80.
6. Akhurst RJ, Boemare NE, Janssen PH, Peel MM, Alfredson DA, Beard CE. Taxonomy of Australian clinical isolates of the genus *Photorhabdus* and proposal of *Photorhabdus asymbiotica* subsp. *asymbiotica* subsp. nov. and *P. asymbiotica* subsp. *australis* subsp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2004;54(Pt 4):1301-10.
7. Akinosoglou K, Perperis A, Siagris D, Goutou P, Spiliopoulou I, Gogos CA, Marangos M. Bacteraemia due to *Cedecea davisae* in a patient with sigmoid colon cancer: a case report and brief review of the literature. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012; 74:303-6.
8. Alballaa SR, Qadri SM, al-Furayh O, al-Qatary K. Urinary tract infection due to *Rahnella aquatilis* in a renal transplant patient. J Clin Microbiol. 1992;30:2948-50.
9. Altun Koroglu O, Yalaz M, Ozalkaya E, Polat DC, Akisu M, Kultursay N. *Kluyvera cryocrescens* in a preterm infant. Jpn J Infect Dis. 2010;63:195-6.
10. Ammenouche N, Dupont H, Mammeri H. Characterization of a novel AmpC β -lactamase produced by a carbapenem-resistant *Cedecea davisae* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58: 6942-5.
11. Antonello VS, Dallé J, Domingues GC, Ferreira JA, Fontoura M do CQ, Knapp FB. Post-cesarean surgical site infection due to *Buttiauxella agrestis*. Int J Infect Dis. 2014;22:65-6.
12. Bae B, Sureka S. *Cedecea davisae* isolated from scrotal abscess. J Urol. 1983;130:148-9.
13. Bali R, Sharma P, Gupta K, Nagrath S. Pharyngeal and peritonsillar abscess due to *Leclercia adecarboxylata* in an immunocompetent patient. J Infect Dev Ctries. 2013;7:46-50.

14. Batista N, Diez O, Moreno A. Acute cholecystitis due to *Kluyvera ascorbata*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2002; 20:370-1.
15. Bayır Ö, Yıldırım G, Saylam G, Yüksel E, Özdek A, Korkmaz M. Atrophic rhinitis caused by *Cedecea davisae* with accompanying mucocoele. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg*. 2015; 25:249-53.
16. Bear N, Klugman KP, Tobiansky L, Koornhof HJ. Wound colonization by *Ewingella americana*. *J Clin Microbiol*. 1986;23:650-1.
17. Bellais S, Poirel L, Fortineau N, Decousser JW, Nordmann P. Biochemical-genetic characterization of the chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Rahnella aquatilis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:2965-8.
18. Bellaoui N, Belabbes H, Lahsoun M. *Kluyvera bacteremia*: an epidemic in a Moroccan teaching Hospital. *Med Mal Infect*. 2009; 39:133-5.
19. Beltrán A, Molinero AV, Capilla S, Polo AM. Isolation of *Leclercia adecarboxylata* from wound exudate of a diabetic patient. *Med Clin (Barc)*. 2004;122:159.
20. Benito MH, Hernández RS, Fernández-Reyes MJ, Hernando S. Sepsis por *Hafnia alvei* en una paciente con trasplante renal. *Nefrologia*. 2008; 28:470-1.
21. Bhowmick T, Weinstein MP. A deceptive case of cellulitis caused by a gram-negative pathogen. *J Clin Microbiol*. 2013;51:1320-3.
22. Bouvet OMM, Grimont PAD, Richard C, Aldova E, Hausner O, Gabrhelova M. *Budvicia aquatica* gen. nov., sp. nov.: a hydrogen sulfide-producing member of the *Enterobacteriaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1985; 35: 60-4.
23. Brady CL, Venter SN, Cleenwerck I, Vandemeulebroecke K, De Vos P, Coutinho TA. Transfer of *Pantoea citrea*, *Pantoea punctata* and *Pantoea terrea* to the genus *Tatumella* emend. as *Tatumella citrea* comb. nov., *Tatumella punctata* comb. nov. and *Tatumella terrea* comb. nov. and description of *Tatumella morbirosei* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010;60(Pt 3):484-94.
24. Brenner DJ, Farmer JJ III. Family I. *Enterobacteriaceae*. En: Garrity GM, editor-in-chief. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd. ed, 2001, vol 2, part B, p. 587-897.

25. Brenner DJ, Farmer JJ III. Family I. *Enterobacteriaceae*. En: Garrity GM, editor-in-chief. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd. ed, 2001, vol 2, part B, p. 740-4
26. Brenner DJ, Müller HE, Steigerwalt AG, Whitney AM, O'Hara CM, Kämpfer P. Two new *Rahnella* genomospecies that cannot be phenotypically differentiated from *Rahnella aquatilis*. *Int J Syst Bacteriol*. 1998;48 Pt 1:141-9.
27. Bukhari SZ, Hussain WM, Fatani MI, Ashshi AM. Multi-drug resistant *Ewingella americana*. *Saudi Med J*. 2008;29:1051-3.
28. Candoni A, Trevisan R, Filì C, Tiribelli M, Fanin R. Abdominal abscess and *Hafnia alvei* septicemia occurring during the aplastic phase after autologous stem-cell transplantation in a patient with diffuse large B-cell lymphoma. *J Infect Chemother*. 2004; 10:303-6.
29. Carinder JE, Chua JD, Corales RB, Taege AJ, Procop GW. *Rahnella aquatilis* bacteremia in a patient with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Scand J Infect Dis*. 2001;33:471-3.
30. Caroff N, Chamoux C, Le Gallou F, Espaze E, Gavini F, Gautreau D, Richet H, Reynaud A. Two epidemiologically related cases of *Rahnella aquatilis* bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1998;17:349-52.
31. Carter JE, Evans TN. Clinically significant *Kluyvera* infections: a report of seven cases. *Am J Clin Pathol*. 2005;123:334–8.
32. Chang CL, Jeong J, Shin JH, Lee EY, Son HC. *Rahnella aquatilis* sepsis in an immunocompetent adult. *J Clin Microbiol*. 1999;37:4161-2.
33. Chao CT, Hung PH, Huang JW, Tsai HB. Cycloer cassette rupture with *Leclercia adecarboxylata* peritoneal dialysis peritonitis. *Perit Dial Int*. 2014;34:131-2.
34. Ciche TA, Ensign JC. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? *Appl Environ Microbiol*. 2003;69:1890–7.
35. Ciche TA, Kim KS, Kaufmann-Daszczuk B, Nguyen KC, Hall DH. Cell invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:2275–87.

36. Clark N, McNeil MM, Swenson JM, O'Hara C, Riddle CF, Anderson RL, Davis BJ, Shulman ST, Martone WJ, Solomon SL. Plasmids of *Ewingella americana*: supplementary epidemiologic markers in an outbreak of pseudobacteremia. J Clin Microbiol. 1987;25:501-3.
37. Corbin A, Delatte C, Besson S, Guidry A, Hoffmann AH 3rd, Monier P, Nathaniel R. *Budvicia aquatica* sepsis in an immunocompromised patient following exposure to the aftermath of Hurricane Katrina. J Med Microbiol. 2007;56(Pt 8):1124-5.
38. Corti G, Mondanelli N, Losco M, Bartolini L, Fontanelli A, Paradisi F. Post-traumatic infection of the lower limb caused by rare *Enterobacteriaceae* and Mucorales in a young healthy male. Int J Infect Dis. 2009;13:e57-60.
39. Costa PS, Mendes JM, Ribeiro GM. *Tatumella ptyseos* causing severe human infection: report of the first two Brazilian cases. Braz J Infect Dis. 2008;12:442-3.
40. Costa SC, Girard PA, Brehélin M, Zumbihl R. The emerging human pathogen *Photorhabdus asymbiotica* is a facultative intracellular bacterium and induces apoptosis of macrophage-like cells. Infect Immun. 2009;77:1022-30.
41. Crandall C, Abbott SL, Zhao YQ, Probert W, Janda JM. Isolation of toxigenic *Hafnia alvei* from a probable case of hemolytic uremic syndrome. Infection. 2006; 34:227-9.
42. Da Costa PS, Tostes MM, de Carvalho Valle LM. A case of keratoconjunctivitis due to *Ewingella americana* and a review of unusual organisms causing external eye infections. Braz J Infect Dis. 2000;4:262-7.
43. Dalamaga M, Karmaniolas K, Arsenis G, Pantelaki M, Daskalopoulou K, Papadavid E, Migdalis I. *Cedecea lapagei* bacteremia following cement-related chemical burn injury. Burns. 2008; 34 :1205-7.
44. Dalamaga M, Karmaniolas K, Pantelaki M, Daskalopoulou K, Kavatha D, Migdalis I. Spontaneous peritonitis caused by *Leminorella grimontii*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2006;56:83-5.
45. Dalamaga M, Pantelaki M, Karmaniolas K, Matekovits A, Daskalopoulou K. Leg ulcer and bacteremia due to *Cedecea davisae*. Eur J Dermatol. 2008; 18:204-5

46. Dalamaga M, Pantelaki M, Karniolas K, Daskalopoulou K, Migdalis I. Isolation of *Leclercia adecarboxylata* from blood and burn wound after a hydrofluoric acid chemical injury. *Burns*. 2009;35:443-5.
47. Dalamaga M, Pantelaki M, Papadavid E, Daskalopoulou K, Karmaniolas K. Epididymo-orchitis and bacteremia caused by *Leclercia adecarboxylata*. *Med Mal Infect*. 2008;38:674-5.
48. Davenport P, Land KJ. Isolation of *Leclercia adecarboxylata* from the blood culture of an asymptomatic platelet donor. *Transfusion*. 2007;47:1816-9.
49. Davis O, Wall B. "Broom straw peritonitis" secondary to *Cedecia lapagei* in a liver transplant recipient. *Perit Dial Int*. 2006; 26:512-3.
50. Daza RM, Iborra J, Alonso N, Vera I, Portero F, Mendaza P. Aislamiento de *Leclercia adecarboxylata* en paciente cirrótico. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1993;11:53-4.
51. de Baere T, Wauters G, Huylenbroeck A, Claeys G, Peleman R, Verschraegen G, Allemeersch D, Vanechoutte M. Isolations of *Leclercia adecarboxylata* from a patient with a chronically inflamed gallbladder and from a patient with sepsis without focus. *J Clin Microbiol*. 2001;39:1674-5.
52. De Baere T, Wauters G, Kämpfer P, Labit C, Claeys G, Verschraegen G, Vanechoutte M. Isolation of *Buttiauxella gaviniae* from a spinal cord patient with urinary bladder pathology. *J Clin Microbiol*. 2002;40:3867-70.
53. De Mauri A, Chiarinotti D, Andreoni S, Molinari GL, Conti N, De Leo M. *Leclercia adecarboxylata* and catheter-related bacteraemia: review of the literature and outcome with regard to catheters and patients. *J Med Microbiol*. 2013;62:1620-3.
54. Devreese K, Claeys G, Verschraegen G. Septicemia with *Ewingella americana*. *J Clin Microbiol*. 1992;30:2746–7.
55. Dionisio D, Belli A, Dionisio A, Poggiali G, Corradini S, Pierotti P, Menci R, Favi P, Mecocci L. Appendicitis: microbial interactions and new pathogens. *Recenti Prog Med* 1992;83:330–6.
56. Duchaud E, Rusniok C, Frangeul L, Buchrieser C, Givaudan A, Taourit S, Bocs S, Boursaux-Eude C, Chandler M, Charles JF, Dassa E, Derose R, Derzelle S,

- Freyssinet G, Gaudriault S, Médigue C, Lanois A, Powell K, Siguier P, Vincent R, Wingate V, Zouine M, Glaser P, Boemare N, Danchin A, Kunst F. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. Nat Biotechnol. 2003;21:1307–13.
57. Eiland EH 3rd, Siddiqui H, Goode AM, Leeth SD. Pneumonia due to multidrug-resistant *Leclercia adecarboxylata*. Am J Health Syst Pharm. 2013;70:940-1.
 58. Fajardo M, Bueno MJ. Aislamiento de *Rahnella aquatilis* en el exudado de una traqueostomía en un paciente con cáncer de laringe. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2000;18:251.
 59. Fajardo Olivares M, Blanco Palenciano J, Márquez Laffón I, Ruiz León JM. *Yokenella regensburgei* infection in a perimalleolar ulcer. Med Clin (Barc). 2005;125:358-9.
 60. Farmer JJ III, Davis BR, Hickman-Brenner FW, McWhorter A, Huntley-Carter GP, Asbury MA, Riddle C, Wathen-Grady HG, Elias C, Fanning GR. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol. 1985;21:46-76.
 61. Farmer JJ III, Fanning GR, Huntley-Carter GP, Holmes B, Hickman FW, Richard C, Brenner DJ. *Kluyvera*, a new (redefined) genus in the family *Enterobacteriaceae*: identification of *Kluyvera ascorbata* sp. nov. and *Kluyvera cryocrescens* sp. nov. in clinical specimens. J Clin Microbiol. 1981; 13: 919-33.
 62. Farmer JJ III, Sheth N, Hudzinski J, Rose HD, Asbury MF. Bacteremia due to *Cedecea neteri* sp. nov. J Clin Microbiol. 1982; 16:775-8.
 63. Farmer JJ, III, Jorgensen JH, Grimont PAD, Akhurst RJ, Poinar GO, Jr, Ageron E, Pierce GV, Smith JA, Carter GP, Wilson KL, Hickman-Brenner FW. *Xenorhabdus luminescens* (DNA hybridization group 5) from human clinical specimens. J Clin Microbiol. 1989;27:1594–600.
 64. Fattal O, Deville JG. *Leclercia adecarboxylata* peritonitis in a child receiving chronic peritoneal dialysis. Pediatr Nephrol. 2000;15:186-7.
 65. Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, García-Sánchez L, García-Reyne A, Ortuño de Solo T, Sanz-Sanz F, Aguado JM. Successful management of tunneled

- hemodialysis catheter-related bacteremia by *Leclercia adecarboxylata* without catheter removal: report of two cases. *Int J Infect Dis.* 2009;13:e517-8.
66. French-Constant RH, Dowling A, Waterfield NR. Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture. *Toxicon.* 2007;49:436-51.
 67. French-Constant RH, Eleftherianos I, Reynolds SE. A nematode symbiont sheds light on invertebrate immunity. *Trends Parasitol.* 2007;23:514–7.
 68. French-Constant RH, Waterfield N, Daborn P, Joyce S, Bennett H, Au C, Dowling A, Boundy S, Reynolds S, Clarke D. *Photorhabdus*: towards a functional genomic analysis of a symbiont and pathogen. *FEMS Microbiol Rev.* 2003;26:433–56.]
 69. Fischer-Le Saux M, Viallard V, Brunel B, Normand P, Boemare NE. Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49 Pt 4:1645-56.
 70. Forrester JD, Adams J, Sawyer RG. *Leclercia adecarboxylata* bacteremia in a trauma patient: case report and review of the literature. *Surg Infect (Larchmt).* 2012;13:63-6
 71. Forst S, Dowds B, Boemare N, Stackebrandt E. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annu Rev Microbiol.* 1997;51:47–72.
 72. Forst S, Nealson K. Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. *Microbiol Rev.* 1996;60:21–43.
 73. Freney J, Husson MO, Gavini F, Madier S, Martra A, Izard D, Leclerc H, Fleurette J. Susceptibilities to antibiotics and antiseptics of new species of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988;32:873-6.
 74. Funke G, Rosner H. *Rahnella aquatilis* bacteremia in an HIV-infected intravenous drug abuser. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1995;22:293-6.

75. Gaitán JI, Bronze MS. Infection caused by *Rahnella aquatilis*. Am J Med Sci. 2010;339:577-9.
76. Gerrard J, Waterfield N, Vohra R, French-Constant R. Human infection with *Photorhabdus asymbiotica*: an emerging bacterial pathogen. Microbes Infect. 2004;6:229–37.
77. Gerrard JG, Joyce SA, Clarke DJ, French-Constant RH, Nimmo GR, Looke DF, Feil EJ, Pearce L, Waterfield NR. Nematode symbiont for *Photorhabdus asymbiotica*. Emerg Infect Dis. 2006;12:1562–4.
78. Gerrard JG, McNevin S, Alfredson D, Forgan-Smith R, Fraser N. *Photorhabdus* species: bioluminescent bacteria as emerging human pathogens? Emerg Infect Dis. 2003;9:251–4.
79. Goubau P, Van Aelst F, Verhaegen J, Boogaerts M. Septicaemia caused by *Rahnella aquatilis* in an immunocompromised patient. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1988;7:697-9.
80. Grimont P, Grimont F, Farmer JJ III, Asbury MA. *Cedecea davisae*, gen. nov., sp. nov. and *Cedecea lapagei* sp. nov., new *Enterobacteriaceae* from clinical specimens. Int J Syst Bacteriol. 1981; 31:317-26
81. Grimont PAD, Farmer JJ III, Grimont F, Asbury MA, Brenner DJ, Deval C. *Ewingella americana* gen. nov., sp. nov., a new enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. Ann Microbiol. 1983; 134A: 39-52.
82. Günthard H, Pennekamp A. Clinical significance of extraintestinal *Hafnia alvei* isolates from 61 patients and review of the literature. Clin Infect Dis. 1996; 22:1040-5.
83. Haji S, Kimura H, Yamashita H. Arthritis and bacteremia due to *Leclercia adecarboxylata*. Intern Med. 2014;53:2659.
84. Hallem EA, Rengarajan M, Ciche TA, Sternberg PW. Nematodes, bacteria, and flies: a tripartite model for nematode parasitism. Curr Biol. 2007;17:898–904.
85. Harrell LJ, Cameron ML, O'Hara CM. *Rahnella aquatilis*, an unusual gram-negative rod isolated from the bronchial washing of a patient with acquired immunodeficiency syndrome. J Clin Microbiol. 1989;27:1671-2.

86. Heizmann WR, Michel R. Isolation of *Ewingella americana* from a patient with conjunctivitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1991;10:957-9.
87. Hess B, Burchett A, Huntington MK. *Leclercia adecarboxylata* in an immunocompetent patient. J Med Microbiol. 2008;57(Pt 7):896-8.
88. Hickman-Brenner FW, Huntley-Carter GP, Fanning GR, Brenner DJ, Farmer JJ 3rd. *Koserella trabulsii*, a new genus and species of *Enterobacteriaceae* formerly known as Enteric Group 45. J Clin Microbiol. 1985;21:39-42.
89. Hickman-Brenner FW, Vohra MP, Huntley-Carter GP, Fanning GR, Lowery VA 3rd, Brenner DJ, Farmer JJ 3rd. *Leminorella*, a new genus of *Enterobacteriaceae*: identification of *Leminorella grimontii* sp. nov. and *Leminorella richardii* sp. nov. found in clinical specimens. J Clin Microbiol. 1985;21:234-9.
90. Hiroshi N, Atsuhito E, Norihito T. Browning discoloration by reheating of foods in container-I: isolation and identification of causal bacteria of browning discoloration of natu daidai. Toyo Junior College of Food Technology and Toyo Institute of Food Technology. 2006;26:45-9.
91. Hollis DG, Hickman FW, Fanning GR, Farmer JJ 3rd, Weaver RE, Brenner DJ. *Tatumella ptyseos* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Enterobacteriaceae* found in clinical specimens. J Clin Microbiol. 1981;14:79-88.
92. Hong S, Lee J, Kim E. First Korean case of *Cedecea lapagei* pneumonia in a patient with chronic obstructive pulmonary disease. Ann Lab Med. 2015; 35: 266-8.
93. Hoppe JE, Herter M, Aleksic S, Klingebiel T, Niethammer D. Catheter-related *Rahnella aquatilis* bacteremia in a pediatric bone marrow transplant recipient. J Clin Microbiol. 1993;31:1911-2.
94. Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. Antimicrob Agents Chemother. 2002, 46:3045-9.
95. Huys G, Cnockaert M, Abbott SL, Janda JM, Vandamme P. *Hafnia paralvei* sp. nov., formerly known as *Hafnia alvei* hybridization group 2. Int J Syst Evol Microbiol. 2010; 60(Pt 8):1725-8.

96. Ismaael T, Zamora E, Khasawneh F. *Cedecea davisae*'s role in a polymicrobial lung infection in a cystic fibrosis patient. Case Rep Infect Dis. 2012; 2012:176864.
97. Isozaki A, Shirai K, Mimura S, Takahashi M, Furushima W, Kawano. A case of urinary tract infection caused by *Kluyvera ascorbata* in an infant: case report and review of the literature. J Infect Chemother. 2010;16:436-8.
98. Izard D, Gavini F, Trinel PA, Leclerc H. *Rahnella aquatilis*, a new member of the *Enterobacteriaceae*. Ann Microbiol (Paris). 1979;130:163-77.
99. Jain S, Gaiind R, Gupta KB, Dawar R, Kumar D, Paul P, Sardana R, Deb M. *Yokenella regensburgei* infection in India mimicking enteric fever. J Med Microbiol. 2013;62(Pt 6):935-9.
100. Janda JM, Abbott SL, Bystrom S, Probert WS. Identification of two distinct hybridization groups in the genus *Hafnia* by 16S rRNA gene sequencing and phenotypic methods. J Clin Microbiol. 2005; 43:3320-3.
101. Janda M, Abbot S. The genus *Hafnia*: from soups to nuts. Clin Microbiol Rev. 2006; 19: 12-25.
102. Janda MJ. New members of the family *Enterobacteriaceae*. En: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, editors. The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria. 3rd ed., Proteobacteria: gamma subclass, Vol.6. Singapore, Springer; 2006. p. 10–1.
103. Jank T, Trillhaase C, Brozda N, Steinemann M, Schwan C, Süss R, Aktories K. Intracellular plasma membrane guidance of *Photorhabdus asymbiotica* toxin is crucial for cell toxicity. FASEB J. 2015;29:2789-802.
104. Jimenez SM, Tiburzi MC, Salsi MS, Pirovani ME, Moguilevsky MA.. The role of visual faecal material as a vehicle for generic *Escherichia coli*, coliform and other enterobacteria contaminating poultry carcasses during slaughtering. J Appl Microbiol. 2003;95:451-6.
105. Jover-Sáenz A, Cerezo-Esforzado E, Barcenilla-Gaite F, Garrido-Calvo S, Porcel-Pérez JM. *Leclercia adecarboxylata* cholecystitis in a patient with metabolic syndrome. Surg Infect (Larchmt). 2008;9:411-2.

106. Karadağ Öncel E, Özsürekcı Y, Akyön Y, Gür D, Cengiz AB, Kara A. *Kluyvera ascorbata* infections in children: a case series. Turk Pediatr Ars. 2015;50:123-8.
107. Kati C, Bibashi E, Kokolina E, Sofianou D. Case of peritonitis caused by *Ewingella americana* in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. J Clin Microbiol. 1999;37:3733-4.
108. Kim HM, Chon CY, Ahn SH, Jung SJ, Han KH, Moon BS, Moon YM. Fatal spontaneous bacterial peritonitis by *Leclercia adecarboxylata* in a patient with hepatocellular carcinoma. Int J Clin Pract. 2008;62:1296-8.
109. Kluyver AJ, van Niel CB. Prospects for a natural system of classification of bacteria. Zentralbl Bakteriell Parasitenkd Infektionskr Hyg. 1936;95:369-403.
110. Kosako Y, Sakazaki R, Yoshizaki E. *Yokenella regensburgei* gen. nov., sp. nov.: a new genus and species in the family *Enterobacteriaceae*. Jpn J Med Sci Biol. 1984;37:117-24.
111. Lang E, Schumann P, Knapp BA, Kumar R, Spröer C, Insam H. *Budvicia diplopodorum* sp. nov. and emended description of the genus *Budvicia*. Int J Syst Evol Microbiol. 2013;63(Pt 1):260-7.
112. Lee B, Sir JJ, Park SW, Kwak CH, Kim SM, Kim SB, Kwak YG, Whang DH, Cho WH, Choi SK. A case of *Leclercia adecarboxylata* endocarditis in a woman with endometrial cancer. Am J Med Sci. 2009;337:146-7.
113. Lin JC, Chen CH, Siu LK. Nosocomial outbreak of *Kluyvera cryocrescens* bacteremia. Infect Control Hosp Epidemiol. 2002, 23:62-4.
114. Longhurst CA, West DC. Isolation of *Leclercia adecarboxylata* from an infant with acute lymphoblastic leukemia. Clin Infect Dis. 2001;32:1659.
115. López L, Ibarra B, de la Garza J, Rada F, Núñez A, López M. First reported case of pneumonia caused by *Cedecea lapagei* in America. Braz J Infect Dis. 2013; 17:626-8.
116. López-Larramona G, Gómez-de-Oña E, Maestre-Muñiz MM, Ruíz-Chicote AM, Galán-Dorado E, González-Delgado L. Bacteriemia por *Kluyvera ascorbata* en un paciente adulto. Rev Esp Quimioter. 2013;26:226-7.

117. Luttrell RE, Rannick GA, Soto-Hernandez JL, Verghese A. *Kluyvera* species soft tissue infection: case report and review. J Clin Microbiol. 1988; 26:2650–1.
118. Madero J, Pratt K, Hall G, Stewart R, Scerbo J, Longworth D. *Kluyvera* mediastinitis following open-heart surgery: a case report. J Clin Microbiol. 1990;28:2848-9.
119. Maertens J, Delforge M, Vandenberghe P, Boogaerts M, Verhaegen J. Catheter-related bacteremia due to *Ewingella americana*. Clin Microbiol Infect. 2001;7:103–4.
120. Maraki S, Samonis G, Marnelakis E, Tselentis Y. Surgical wound infection caused by *Rahnella aquatilis*. J Clin Microbiol. 1994;32:2706-8.
121. Maraki S. Acute conjunctivitis caused by *Ewingella americana*. J Pediatr Ophthalmol Strabismus. 2012;49 Online:e52-4.
122. Marco Lattur MD, Payeras Cifre A, Bover Barceló I. Infection of reservoir-central venous catheter by *Leclercia adecarboxylata* in a patient with Ewing sarcoma. Med Clin (Barc). 2010;134:660-1.
123. Mardaneh J, Soltan Dallal MM, Taheripoor M, Rajabi Z. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility pattern of *Tatumella ptyseos* strains isolated from powdered infant formula milk consumed in neonatal intensive care unit: first report from Iran. Jundishapur J Microbiol. 2014;7:e10608.
124. Marina VP, Abidi S, Malhotra D. *Leclercia adecarboxylata*, an unusual hemodialysis catheter-related infection. Int Urol Nephrol. 2011;43:1257-8.
125. Martínez MM, Sánchez G, Gómez J, Mendaza P, Daza RM. Aislamiento de *Leclercia adecarboxylata* en un exudado de úlcera. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1998;16:345.
126. Matsukura H, Katayama K, Kitano N, Kobayashi K, Kanegane C, Higuchi A, Kyotani S. Infective endocarditis caused by an unusual gram-negative rod, *Rahnella aquatilis*. Pediatr Cardiol. 1996;17:108-11.
127. Mawardi H, Pavlakis M, Mandelbrot D, Woo SB. Sirolimus oral ulcer with *Cedecea davisae* superinfection. Transpl Infect Dis. 2010; 12:446-50.

128. Mazzariol A, Zuliani J, Fontana R, Cornaglia G. Isolation from blood culture of a *Leclercia adecarboxylata* strain producing an SHV-12 extended-spectrum beta-lactamase. J Clin Microbiol. 2003;41:1738-9.
129. McNeil MM, Davis BJ, Anderson RL, Martone WJ, Solomon SL. Mechanism of cross-contamination of blood culture bottles in outbreaks of pseudobacteremia associated with nonsterile blood collection tubes. J Clin Microbiol. 1985;22:23–5.
130. McNeil MM, Davis BJ, Solomon SL, Anderson RL, Shulman ST, Gardner S, Kabat K, Martone WJ. *Ewingella americana*: recurrent pseudobacteremia from a persistent environmental reservoir. J Clin Microbiol. 1987;25:498–500.
131. Michael Z, McGann PT, Alao O, Stevenson L, Lesho E, Viscount H. Isolation of *Leclercia adecarboxylata* from an infected war wound in an immune competent patient. Mil Med. 2013;178:e390-3
132. Moonah S, Deonaraine K, Freeman C. Multidrug resistant *Kluyvera ascorbata* septicaemia in an adult patient: a case report. J Med Case Reports. 2010, 29;4: 197.
133. Moore JE, Xu J, Millar BC. Diversity of the microflora of edible macroalga (*Palmaria palmate*). Food Microbiology. 2002;19:249-57.
134. Moreno M, Troncoso M, Coria De La H P, Ledermann W, Del Valle G, Núñez C, Araya P, Fernández J, Fernández A. Reporte de cuatro casos de bacteriemia por *Hafnia alvei* en una unidad cardio-quirúrgica pediátrica. Rev Chil Infect. 2010;27:40-4.
135. Moreno M. Retrato microbiológico. Rev Chil Infect. 2009;26:355.
136. Moriyama K, Ando C, Tashiro K, Kuhara S, Okamura S, Nakano S, Takagi Y, Miki T, Nakashima Y, Hirakawa H. Polymerase chain reaction detection of bacterial *16S rRNA* gene in human blood. Microbiol Immunol. 2008;52:375-82.
137. Müller HE, Brenner DJ, Fanning GR, Grimont PA, Kämpfer P. Emended description of *Buttiauxella agrestis* with recognition of six new species of *Buttiauxella* and two new species of *Kluyvera*: *Buttiauxella ferragutiae* sp. nov., *Buttiauxella gaviniae* sp. nov., *Buttiauxella brennerae* sp. nov., *Buttiauxella izardii* sp. nov., *Buttiauxella noackiae* sp. nov., *Buttiauxella warmboldiae* sp. nov.,

- Kluyvera cochleae* sp. nov., and *Kluyvera georgiana* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1996 ;46:50-63.
138. Myers KA, Jeffery RM, Lodha A. Late-onset *Leclercia adecarboxylata* bacteraemia in a premature infant in the NICU. Acta Paediatr. 2012;101:e37-9.
 139. Narchi H. *Kluyvera* urinary tract infection: case report and review of the literature. Pediatr Infect Dis J. 2005;24:570-2.
 140. Nelson MU, Maksimova Y, Schulz V, Bizzarro MJ, Gallagher PG. Late-onset *Leclercia adecarboxylata* sepsis in a premature neonate. J Perinatol. 2013;33:740-2.
 141. Nevondo TS, Cloete TE. Bacterial and chemical quality of water supply in the Dertig village settlement. Water SA. 1999;25:215-20.
 142. Oh HM, Tay L. Bacteraemia caused by *Rahnella aquatilis*: report of two cases and review. Scand J Infect Dis. 1995;27:79-80.
 143. O'Hara K, Chen J, Shigenobu F, Nakamura A, Taniguchi K, Shimojima M, Ida H, Yoshikawa E, Tsuboi I, Mizuoka K, Sawai T. Appearance of fosfomycin resistant *Rahnella aquatilis* clinically isolated in Japan. Microbios. 1998;95:109-15.
 144. Oteo J, Gómez-Garcés JL, Alós JI. Acute cholecystitis and bacteremia caused by *Kluyvera ascorbata* in a cirrhotic patient. Clin Microbiol Infect. 1998; 4:113-5.
 145. Papagiannitsis CC, Studentová V, Hrabák J, Kubele J, Jindrák V, Zemlicková H. Isolation from a nonclinical sample of *Leclercia adecarboxylata* producing a VIM-1 metallo- β -lactamase. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:2896-7.
 146. Paradis S, Boissinot M, Paquette N, Bélanger SD, Martel EA, Boudreau DK, Picard FJ, Ouellette M, Roy PH, Bergeron MG. Phylogeny of the *Enterobacteriaceae* based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase subunit. Int J Syst Evol Microbiol. 2005; 55: 2013-25.
 147. Peel MM, Alfredson DA, Gerrard JG, Davis JM, Robson JM, McDougall RJ, Scullie BL, Akhurst RJ. Isolation, identification, and molecular characterization of strains of *Photobacterium luminescens* from infected humans in Australia. J Clin Microbiol. 1999;37:3647-53.

148. Peretz A, Simsolo C, Farber E, Roth A, Brodsky D, Nakhoul F. A rare bacteremia caused by *Cedecea davisae* in patient with chronic renal disease. Am J Case Rep. 2013; 14:216–8.
149. Pérez-Moreno MO, Anguera J, Carulla M, Pérez-Moreno M. Artritis séptica por *Leclercia adecarboxylata* de origen probablemente yatrogénico. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003;21:167-8.
150. Perkins S, Beckett T, Bump C. *Cedecea davisae* bacteremia. J Clin Microbiol. 1986; 24: 675-6.
151. Pien FD, Bruce AE. Nosocomial *Ewingella americana* bacteremia in an intensive care unit. Arch Intern Med. 1986;146:111–2.
152. Pien FD, Farmer JJ, 3rd, Weaver RE. Polymicrobial bacteremia caused by *Ewingella americana* (family *Enterobacteriaceae*) and an unusual *Pseudomonas* species. J Clin Microbiol. 1983;18:727–9.
153. Pound MW, Tart SB, Okoye O. Multidrug-resistant *Ewingella americana*: a case report and review of the literature. Ann Pharmacother. 2007;41:2066-70.
154. Reina J, Lopez A. Clinical and microbiological characteristics of *Rahnella aquatilis* strains isolated from children. J Infect. 1996;33:135-7.
155. Ribeiro VB, Zavascki AP, Nodari CS, Sandri AM, Silva MP, Campos JC, Sampaio JL, Barth AL. Detection of blaKPC-2 in a carbapenem-resistant *Kluyvera georgiana*. J Antimicrob Chemother. 2012;67:2776-7.
156. Richard C. New *Enterobacteriaceae* found in medical bacteriology *Moellerella wisconsensis*, *Koserella trabulsii*, *Leclercia adecarboxylata*, *Escherichia fergusonii*, *Enterobacter asbutiae*, *Rahnella aquatilis*. Ann Biol Clin (Paris). 1989;47:231-6.
157. Rodríguez JA, Sánchez FJ, Gutiérrez N, García JE, García-Rodríguez JA. Peritonitis bacteriana por *Leclercia adecarboxylata* en un paciente sometido a diálisis peritoneal. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2001;19:237-8.
158. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. Clin Microbiol Infect. 2008;14 Suppl 1:33-41.

159. Ryoo NH1, Ha JS, Jeon DS, Kim JR, Kim HC. A case of pneumonia caused by *Ewingella americana* in a patient with chronic renal failure. J Korean Med Sci. 2005;20:143-5.
160. Salazar G, Almeida A, Gómez M. Infección de herida traumática por *Cedecea lapagei*. Comunicación de un caso y revisión de la literatura. Rev Chil Infectol. 2013; 30:86-9.
161. Sarria J, Vidal A, Kimbrough R. Infections caused by *Kluyvera* species in humans. Clin Infect Dis. 2001; 33:e69–74.
162. Savini V, Di Bartolomeo E, Catavittello C, Talia M, Manna A, Febbo F, Balbinot A, Di Bonaventura G, Di Bartolomeo P, Piccolomini R, D'Antonio D. Graft versus host disease-related *Hafnia alvei* colonization and probable infection. J Med Microbiol. 2008; 57(Pt 9):1167-9.
163. Sezer MT, Gültekin M, Günseren F, Erkiliç M, Ersoy F. A case of *Kluyvera cryocrescens* peritonitis in a CAPD patient. Perit Dial Int. 1996;16:326–7.
164. Shah A, Nguyen J, Sullivan LM, Chikwava KR, Yan AC, Treat JR. *Leclercia adecarboxylata* cellulitis in a child with acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Dermatol. 2011;28:162-4.
165. Sharma D, Dasi T, Murki S, Oleti TP. *Kluyvera ascorbata* sepsis in an extremely low birth weight infant. Indian J Med Microbiol. 2015;33:437-9.
166. Shin GW, You MJ, Lee HS, Lee CS. Catheter-related bacteremia caused by multidrug-resistant *Leclercia adecarboxylata* in a patient with breast cancer. J Clin Microbiol. 2012;50:3129-32.
167. Silva VA, Dias ES, do Vale RHP, Silva R, Moreira GF. Isolamento e identificação de bactérias presentes nos solos de cobertura utilizados no cultivo do cogumelo *Agaricus blazei* Murril. Ciência e Agrotecnologia 2007;31:1364-73.
168. Skurnik D, Nucci A, Ruimy R, Lasocki S, Muller-Serieys C, Montravers P, Andremont A, Courvalin P. Emergence of carbapenem resistant *Hafnia*: the fall of the last soldier. Clin Infect Dis. 2010;50: 1429-30.

169. Stanic M, Meusburger E, Hartmann G, Lhotta K. *Hafnia alvei* urosepsis in a kidney transplant patient. Case Report in Transplantation. Vol. 2015. Article ID 863131:1-3.
170. Stock I, Burak S, Wiedemann B. Natural antimicrobial susceptibility patterns and biochemical profiles of *Leclercia adecarboxylata* strains. Clin Microbiol Infect. 2004;10:724-33.
171. Stock I, Grüger T, Wiedemann B. Natural antibiotic susceptibility of *Rahnella aquatilis* and *R. aquatilis*-related strains. J Chemother. 2000;12:30–9.
172. Stock I, Sherwood KJ, Wiedemann B. Antimicrobial susceptibility patterns, beta-lactamases, and biochemical identification of *Yokenella regensburgei* strains. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004;48:5-15.
173. Stone ND, O'Hara CM, Williams PP, McGowan JE, Jr., Tenover FC. Comparison of disk diffusion, VITEK 2, and broth microdilution antimicrobial susceptibility test results for unusual species of *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol. 2007; 45: 340-6.
174. Tam V, Nayak S. Isolation of *Leclercia adecarboxylata* from a wound infection after exposure to hurricane-related floodwater. BMJ Case Rep. 2012. pii: bcr-2012-007298.
175. Tamura K, Sakazaki R, Kosako Y, Yoshizaki E. *Leclercia adecarboxylata*, gen. nov, comb. nov., formerly known as *Escherichia adecarboxylata*. Curr Microbiol. 1986; 13: 179-84.
176. Tan SC, Wong YH, Jegathesan M, Chang SM. The first isolate of *Tatumella ptyseos* in Malaysia. Malays J Pathol. 1989;11:25-7.
177. Tash K. *Rahnella aquatilis* bacteremia from a suspected urinary source. J Clin Microbiol. 2005;43:2526-8.
178. Temesgen Z, Toal DR, Cockerill FR 3rd. *Leclercia adecarboxylata* infections: case report and review. Clin Infect Dis. 1997;25:79-81.
179. Torre D, Crespi E, Bernasconi M, Rapazzini P. Urinary tract infection caused by *Kluyvera ascorbata* in an immunocompromised patient: case report and review. Scand J Infect Dis. 2005;37:375-8.

180. Tounsi S, Blight M, Jaoua S, de Lima Pimenta A. From insects to human hosts: Identification of major genomic differences between entomopathogenic strains of *Photorhabdus* and the emerging human pathogen *Photorhabdus asymbiotica*. Int J Med Microbiol. 2006;296:521-30.
181. Tracz DM, Gilmour MW, Mabon P, Beniac DR, Hoang L, Kibsey P, Van Domselaar G, Tabor H, Westmacott GR, Corbett CR, Bernard KA. *Tatumella saanichensis* sp. nov., isolated from a cystic fibrosis patient. Int J Syst Evol Microbiol. 2015;65(Pt 6):1959-66.
182. Tsokos M. Fatal Waterhouse-Friderichsen syndrome due to *Ewingella americana* infection. Am J Forensic Med Pathol. 2003;24:41-4.
183. Waterfield NR, Ciche T, Clarke D. *Photorhabdus* and a host of hosts. Annu Rev Microbiol. 2009;63:557–74
184. Weissfeld AS, Halliday RJ, Simmons DE, Trevino EA, Vance PH, O'Hara CM, Sowers EG, Kern R, Koy RD, Hodde K, Bing M, Lo C, Gerrard J, Vohra R, Harper J. *Photorhabdus asymbiotica*, a pathogen emerging on two continents that proves that there is no substitute for a well-trained clinical microbiologist. J Clin Microbiol. 2005;43:4152-5.
185. West BC, Vijayan H, Shekar R. *Kluyvera cryocrescens* finger infection: case report and review of eighteen *Kluyvera* infections in human beings. Diagn Microbiol Infect Dis. 1998;32:237-41.
186. Wilkinson P, Paszkiewicz K, Moorhouse A, Szubert JM, Beatson S, Gerrard J, Waterfield NR, French-Constant RH. New plasmids and putative virulence factors from the draft genome of an Australian clinical isolate of *Photorhabdus asymbiotica*. FEMS Microbiol Lett. 2010;309:136-43.
187. Wilkinson P, Waterfield NR, Crossman L, Corton C, Sánchez-Contreras M, Vlisidou I, Barron A, Bignell A, Clark L, Ormond D, Mayho M, Bason N, Smith F, Simmonds M, Churcher C, Harris D, Thompson NR, Quail M, Parkhill J, French-Constant RH. Comparative genomics of the emerging human pathogen *Photorhabdus asymbiotica* with the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*. BMC Genomics. 2009;10:302.

188. Wong VK. Broviac catheter infection with *Kluyvera cryocrescens*: a case report. J Clin Microbiol. 1987; 25: 1115-6.
189. Yagüe Muñoz A, Castro Castro H, Paredes Arranz C. Aislamiento de *Koserella trabulsi* de muestras clínicas. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1989;7:393-4.
190. Yogev R, Kozlowski S. Peritonitis due to *Kluyvera ascorbata*: case report and review. Rev Infect Dis. 1990;12:399-402.

Apéndice IV. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Agar hierro tres azúcares (TSI)

Fundamento

El medio fue diseñado para determinar la habilidad de las bacterias de fermentar hidratos de carbono y producir sulfuro de hidrógeno (H₂S). El medio contiene una parte (0.1 %) de glucosa y diez partes (1.0 %) de lactosa y sacarosa. El indicador de pH es el rojo fenol y el sulfato ferroso pone en evidencia la formación de H₂S. Si el microorganismo fermenta glucosa, tanto el

fondo como la superficie aparecerán de color amarillo. Si la bacteria fermenta lactosa y/o sacarosa, la superficie permanecerá ácida (amarilla). Si no fermenta lactosa, la superficie se vuelve alcalina (roja). Los microorganismos que no fermentan glucosa no producen cambios en el pH del medio o producirán productos alcalinos y el medio TSI permanecerá rojo. La producción de H₂S se manifiesta por un ennegrecimiento del medio por formación de SFe.

Materiales

El medio está disponible comercialmente. Disolver en agua destilada y dispensar volúmenes de 5.0 ml en tubos con tapa a rosca; autoclavar a 121 °C durante 15 minutos y enfriar inclinado dejando un fondo de 5 a 10 mm. El sustrato es estable por 3 meses. Rotular indicando fecha de preparación y de expiración.

Guardar en heladera; si hay cambio de color no usar.

Procedimiento

- A. Con un ansa estéril tomar la colonia a identificar.
- B. Punzar el fondo en el centro.
- C. Retirar el ansa y estriar sobre la superficie del agar.
- D. Dejar la tapa floja para permitir intercambio de aire.
- E. Incubar a 37 °C durante 18 - 24 h.

Resultados

- A. Superficie ácida / fondo ácido (amarillo / amarillo): fermentación de glucosa, sacarosa y/o lactosa (p. ej. *E. coli*).
- B. Superficie alcalina / fondo ácido (rojo / amarillo): fermentación de glucosa solamente (p. ej. *Shigella* spp.).
- C. Superficie alcalina / fondo alcalino (rojo / rojo): no fermentador de glucosa (p. ej. *Pseudomonas aeruginosa*).
- D. Precipitado negro en el fondo: producción de H₂S(p. ej. *Salmonella* spp).
- E. Burbujas o roturas: producción de gas (p. ej. *E. coli*, *Salmonella* spp.).

Control de Calidad

Bacteria	Superficie	Fondo	H ₂ S
<i>Salmonella</i> ser. Typhi	K	A	+
<i>Salmonella</i> ser. Paratyphi A	K	Ac/g	-
<i>Salmonella</i> spp.	K	A	+
<i>Shigella</i> spp.	K	A	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	A	Ac/g	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	A	Ac/g	-
<i>Escherichia coli</i>	A	Ac/g	-
<i>Citrobacter</i>	A	Ac/g	+
<i>Klebsiella</i>	A	Ac/g	-
<i>Proteus vulgaris</i>	A	A o Ac/g	+(sucio)

<i>Proteus mirabilis</i>	K	Ac/g o A	+ (sucio)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A	Ac/g o A	-

(*) Solo en la parte superior de la punción o formación de un anillo.

A: ácido; K: alcalino; c/g: con gas

Consideraciones

- A. Cuando se agrupan los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, las reacciones del TSI pueden variar ligeramente. Algunos no fermentadores de lactosa pueden fermentar sacarosa.
- B. La prueba se debe leer entre las 18 - 24 h. Lecturas tempranas pueden dar falsos resultados ácido/ácido, mientras que lecturas tardías pueden dar falsos resultados alcalino/alcalino.
- C. Una gran producción de H₂S enmascara la reacción de la glucosa. Sin embargo la glucosa fue fermentada aunque no se vea el cambio de color. Observar si hay producción de gas.
- D. En el TSI, la utilización de sacarosa puede suprimir el mecanismo enzimático que resulta en la producción de H₂S.

Agar lisina hierro (LIA)

Fundamento

La descarboxilación de la lisina a cadaverina produce una alcalinización del medio y un viraje al violeta del indicador púrpura de bromocresol. Como la reacción tiene lugar en medio ácido, es necesario la fermentación previa de la glucosa.

Los microorganismos que no descarboxilan la lisina, pero fermentan la glucosa producen un viraje al amarillo en todo el medio. La formación de H₂S produce una coloración negra debido al sulfuro ferroso producido.

Las bacterias del grupo *Proteus-Providencia*, con excepción de *Morganella morganii*, desaminan la lisina a ácido α -cetocarbónico que forma compuestos pardo-rojizos en el medio de cultivo con la sal de hierro y en aerobiosis.

Materiales

El medio está disponible comercialmente. Disolver el polvo en agua destilada y dispensar en volúmenes de 3 ml en tubos con tapa a rosca. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar de manera de tener estría y fondo. Guardar en heladera.

Procedimiento

Inocular punzando el fondo y luego estriar la superficie del agar. Incubar a 37°C durante 18 - 24 h (a veces pueden ser necesarias 48 h).

Resultados

Los microorganismos que descarboxilan la lisina producen un viraje al violeta.

Los microorganismos que no descarboxilan la lisina y fermentan glucosa producen un viraje al amarillo.

La formación de H₂S se indica por la aparición de una coloración negra.

Control de Calidad

Bacteria	Estría	Punción	H ₂ S
<i>Salmonella</i> sp.	K	K	+
<i>Proteus mirabilis</i>	D	A	+
<i>Proteus vulgaris</i>	D	A	+
<i>Morganella morganii</i>	K	A	-
<i>Providencia. rettgeri</i>	D	A	-
<i>Providencia</i> spp.	D	A	-
<i>Citrobacter</i> spp.	K	A	+
<i>Escherichia coli</i>	K	A	-
<i>Shigella</i> spp.	K	A	-
<i>Klebsiella</i> spp.	K	A	-

A: ácido; K: alcalino; D: desaminación de la lisina

Este medio no es un sustituto del método estándar de Moeller.

Consideraciones

Dado que descarboxilación de la lisina ocurre únicamente a pH ácido, este medio sólo puede utilizarse para diferenciar cultivos que fermenten glucosa.

Prueba de la oxidasa

Fundamento

La prueba de la oxidasa se basa en la producción bacteriana de una enzima (oxidasa) y se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa.

Todas las bacterias aeróbicas obtienen su energía por la respiración, proceso responsable de la oxidación de diversos sustratos. El oxígeno molecular oxida un sustrato con la intervención del transporte de electrones y es el aceptor final, produciendo agua o peróxido de hidrógeno al combinarse con hidrógeno según la especie bacteriana y su sistema enzimático.

Se demostró que todas las bacterias oxidasa positivas que se estudiaron eran aerobias o anaerobias facultativas.

Los microorganismos anaerobios estrictos carecen de actividad oxidasa porque no pueden vivir en presencia del oxígeno atmosférico y no poseen el sistema citocromooxidasa.

Si la bacteria produce oxidasa, cuando ésta se encuentra en presencia de oxígeno, citocromo y un reactivo factible de oxidar, oxidan dicho reactivo para formar un compuesto coloreado. Se sustituyen los aceptores electrónicos en cualquier sitio de la cadena de transporte, por sustratos artificiales, y este es el fundamento de la técnica de esta reacción.

Técnica

En la práctica se usan discos comerciales embebidos en una solución estabilizada de oxalato de N,N-dimetilparafenilendiamina (hay otros reactivos como opciones).

En un tubo de hemólisis, se prepara una suspensión densa del microorganismo en estudio, en aproximadamente 0,2 ml de agua destilada.

Colocar un disco del reactivo: rápidamente se producirá un color rosado que se intensificará hacia el fucsia, cuando la reacción es positiva.

La reacción ocurre en forma inmediata; una reacción lenta (más de dos minutos) debe ser considerada negativa.

Si hubiera escaso número de colonias sospechosas, se humedece el disco con una gota de agua y luego se coloca sobre él una de las colonias en estudio, extendiendo con un ansa. Se observará de inmediato la pigmentación ya descrita en la zona correspondiente a la colonia transferida.

Aclaración: Deben emplearse cultivos frescos (18-24 h) y en lo posible no desarrollados en medios de cultivo con pH ácido o con hidratos de carbono utilizables (ej: glucosa), ya que su fermentación podría inhibir la actividad de la enzima y podrían obtenerse resultados falsamente negativos.

Agar SIM

Fundamento

Es un medio que se usa para determinar la formación de sulfuro de hidrógeno, la producción de indol y la movilidad en el diagnóstico de enterobacterias.

Materiales

El medio está disponible comercialmente.

Disolver en agua destilada, calentar suavemente hasta su disolución y dispensar en volúmenes de 5 ml en tubos con tapa a rosca. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos; enfriar en posición vertical y guardar en heladera.

Procedimiento

- A. Con un ansa tomar material de una colonia y sembrar por punción.
- B. Incubar a 37 °C durante 18 - 24 h.

Resultados

- A. Para la producción de H₂S

Ensayo positivo: ennegrecimiento del medio.

Ensayo negativo: no hay ennegrecimiento.

- B. Para la movilidad

Ensayo positivo: hay una turbiedad difusa del medio.

Ensayo negativo: sólo hay crecimiento a lo largo de la punción.

- C. Para la producción de indol

Ensayo positivo: aparición de color rojo cuando se agrega el reactivo de Ehrlich.

Ensayo negativo: no hay aparición de color.

Control de Calidad

Escherichia coli: H₂S -, indol +, movilidad +

Klebsiella pneumoniae: H₂S -, indol -, movilidad -

Proteus vulgaris: H₂S +, indol +, movilidad +

Consideraciones

Una bacteria que produce sulfuro de hidrógeno podría mostrar ennegrecimiento del medio SIM aunque no lo haga en el TSI, por la presencia de sacarosa en este último medio. La utilización de la sacarosa puede suprimir los mecanismos enzimáticos responsables de la producción del sulfuro de hidrógeno.

Prueba del indol

Fundamento

El indol es uno de los productos del metabolismo del aminoácido triptófano. Con un medio rico en triptófano, el indol se puede detectar por su habilidad para combinarse con ciertos aldehídos para formar un compuesto coloreado. El ensayo constituye un método rápido para detectar bacterias productoras de indol. Como indicador de la presencia del aldehído se usa el reactivo de Ehrlich. Es especialmente útil en la identificación preliminar de *Escherichia coli*, y para diferenciar *Edwardsiella* (+) de *Salmonella* (-).

Materiales

A. Caldo triptófano

- Peptona 20,0 gr
- Cloruro de sodio 5,0 gr
- Agua destilada 1000 ml

A este caldo se le incorpora triptófano en una concentración del 1%. El medio se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos. Dejar enfriar antes de su empleo y guardar a 4-10 °C para su conservación.

B. Reactivo de Ehrlich

- p-dimetilaminobenzaldehído 1,0 g
- alcohol etílico, 95% 95,0 ml
- ácido clorhídrico, concentrado 20,0 ml

Se disuelve el aldehído en el alcohol (puede requerir un calentamiento suave), luego se agrega lentamente el ácido. El reactivo de color amarillo es estable por un año. Identificar el reactivo con una etiqueta y guardar refrigerado en botellas color caramelo.

Procedimiento

- 1) Con un ansa tomar material de una colonia aislada e inocular el caldo que contiene triptófano.
- 2) Incubar a 37 °C durante 18 - 24 h.
- 3) Transferir 2 ml de la suspensión de caldo a un segundo tubo.
- 4) Agregar 5 gotas del reactivo de Ehrlich por la pared del tubo.

- 5) Agitar el tubo y observar un color rosado en la interfase entre el caldo y el reactivo.
- 6) Si el ensayo es negativo, el cultivo se debe reincubar otras 24 h.

Resultados

Ensayo positivo: desarrollo de un color rojo en la interfase del reactivo y el caldo, segundos después de agregar el reactivo.

Ensayo negativo: no hay cambio de color o hay un color amarillo en la interfase.

Control de Calidad

Cualquiera de los reactivos debe ser controlado con cultivos positivos y negativos conocidos, antes de su empleo general. Como controles resultan convenientes cepas de fácil obtención y que su conservación en cultivos madre no ofrezca problemas.

Escherichia coli +

Enterobacter aerogenes -

Klebsiella pneumoniae -

Consideraciones

- 1) El pH óptimo para la actividad de la triptofanasa es ligeramente alcalino (7,4-7,8). La disminución del pH provoca una reducción en la producción de indol y una reacción falsamente negativa o débilmente positiva.
- 2) Los cultivos a los cuales se les efectúa la prueba del indol deben ser incubados aeróbicamente. El descenso en la tensión de oxígeno disminuye la producción de indol.

No debe emplearse un medio con peptona que contenga glucosa porque la elevada acidez producida por la fermentación del azúcar puede inhibir la actividad de la triptofanasa. El agregado de triptófano estimula la producción de indol, mientras que la glucosa la inhibe.

Prueba de la β -galactosidasa (ONPG)

Fundamento

La fermentación de la lactosa requiere de dos enzimas. Mientras la permeasa facilita la penetración de la molécula de lactosa dentro de la célula bacteriana, la β -galactosidasa hidroliza la lactosa para formar galactosa y glucosa. Las bacterias no fermentadoras de lactosa carecen de ambas enzimas, sin embargo hay bacterias que tienen la β -galactosidasa pero no la permeasa. El o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) es un compuesto incoloro estructuralmente similar a la lactosa. En presencia de β -galactosidasa,

el ONPG se rompe en galactosa y o-nitrofenol, un compuesto de color amarillo. Como los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* se agrupan de acuerdo a su habilidad de fermentar lactosa, esta prueba es útil en la identificación de bacterias fermentadoras de lactosa.

Materiales

A. Solución de ONPG

Disolver 80,0 mg de ONPG en 15,0 ml de agua destilada a 37 °C, agregar 5,0 ml del *buffer* fosfato, ajustar a pH 7,0 y esterilizar por filtración. La solución es estable por 6 meses. Rotular la solución y guardar refrigerada (4 a 8 °C), en recipientes de color caramelo o envueltos en papel de aluminio.

B. *Buffer* fosfato de sodio 1M (pH 7,0)

Disolver 6,9 gr de $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 45,0 ml de agua destilada. Agregar 3,0 ml de una solución de NaOH al 30 % (w/v) y ajustar el pH a 7,0. Llevar el volumen a 50,0 ml con agua destilada y guardar a 4 °C.

Procedimiento

A partir de un cultivo en agar TSI, hacer una suspensión espesa de la bacteria a ensayar en 0,5 ml de solución salina. El volumen no tiene mayor importancia porque es una prueba basada en la observación de un cambio de color.

- A. Agregar un disco o dos gotas de solución de ONPG.
- B. Incubar la mezcla a 37 °C y examinar cambio de color hasta 24 h.

Resultados

Ensayo positivo: desarrollo de color amarillo.

Ensayo negativo: no hay desarrollo de color.

Control de calidad

Escherichia coli +

Salmonella spp.(-)(excepto *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* y *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*).

Consideraciones

A. Se puede partir de estrías de agar nutritivo con 1 % de lactosa, cuando no se dispone de TSI.

B. La solución de ONPG preparada debe ser incolora antes de su empleo.

C. A veces se puede favorecer la liberación de la enzima agregando una gota de tolueno, se deja reposar unos minutos a 37 °C y se agrega luego la solución de ONPG.

Pruebas de utilización de azúcares

Fundamento

Es un ensayo para determinar la capacidad de un microorganismo de fermentar un hidrato de carbono con producción de ácido o ácido y gas. El patrón de utilización de azúcares ayuda en la diferenciación e identificación de muchas bacterias. En este ensayo, determinados azúcares se agregan a un medio basal estéril. La producción de ácido se manifiesta por un cambio de color del indicador. La elección del medio y del indicador dependen del camino metabólico del microorganismo y de la claridad visual del cambio de pH.

Materiales

A. Medio base

- Peptona 10,0 g
- Extracto de carne 1,0 g
- Cloruro de sodio 5,0 g
- Azul de bromotimol 10,0 ml
- Indicador de Andrade 5,0 ml
- Agua destilada 1000 ml

Rehidratar los ingredientes con agua destilada, calentando suavemente si es necesario; ajustar el pH a 7,1-7,2. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos y enfriar en baño de agua a 50°C. Fraccionar el medio base en alícuotas y agregar los azúcares esterilizados por filtración en concentraciones de 0,5 % para dulcitol y salicina y 1,0% para los otros azúcares. Dispensar en volúmenes

de 4-5 ml en tubos con tapa a rosca, estériles. El medio se guarda en heladera y es estable por 3 meses.

Para la glucosa y glicerol, el medio base se dispensa en tubos con campanita de Durham antes de autoclavar. La campanita se llenará con el medio y luego se agrega el azúcar estérilmente después de enfriar a 50°C.

B. Indicador de Andrade

Disolver 0,5 gr de fucsina ácida en 100 ml de agua destilada, agregar 15,0 ml de NaOH 1N (4 %); mezclar bien y dejar descansar a temperatura ambiente durante 24h, agitando frecuentemente. El color rojo se debe transformar en un color castaño. Si no se produce una decoloración suficiente agregar 1,0 ml de NaOH 1N (4 %).

C. Solución de azul de bromotimol

Mezclar 47,5 ml de agua destilada con 2,5 ml de NaOH 0,1N y luego agregar 0,1 g de indicador.

Procedimiento

- 1) Con un ansa estéril tomar material de un cultivo en medio sólido.
- 2) Sumergir el ansa en cada tubo de hidrato de carbono.

Para una batería de 8 a 10 azúcares, es suficiente un único inóculo, no hay necesidad de esterilizar el ansa entre tubo y tubo. La posibilidad de transportar el hidrato de carbono de

tubo a tubo es infinitesimal y no afectará los resultados. Para una batería grande (15 a 20) de azúcares, puede ser necesario emplear 2 a 3 inóculos, esterilizando el ansa antes de tomar nueva muestra.

3) Incubar a 37°C y examinar día por día durante 4 a 5 días.

Para algunos microorganismos puede ser necesario una incubación más prolongada (7 días), registrando los resultados día por día.

4) En laboratorios de referencia las lecturas se deben prolongar hasta 30 días.

Resultados

Ensayo positivo: viraje del indicador al rojo-rosado por acidificación del medio.

Ensayo negativo: no hay cambio de color.

Control de calidad

Con distintos microorganismos que fermenten los azúcares, como por ejemplo:

Escherichia coli: glucosa +

Klebsiella spp: lactosa +

Yersinia enterocolitica: sacarosa +

Consideraciones

A. Inocular un medio basal sin azúcar para cada microorganismo

- B. La campanita de Durham se usa solo en el tubo que contiene glucosa porque si el microorganismo produce gas a partir de glucosa, producirá gas con los otros azúcares
- C. Como cualquier indicio de gas (aún una burbuja pequeña) es evidencia de producción de gas, observar cuidadosamente la campanita antes de inocular

Prueba de utilización del citrato (Citrato de Simmons)

Fundamento

Ciertos microorganismos tienen la habilidad de utilizar citrato, un metabolito intermedio del ciclo de Krebs, como única fuente de carbono externa. Es un medio para evidenciar la utilización del citrato en presencia de sales de amonio inorgánicas. Las bacterias capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono, utilizan también las sales de amonio como única fuente de nitrógeno, que se desdoblan para dar amoníaco. El resultado es un medio ambiente alcalino que hace virar el indicador azul de bromotimol a un color azul intenso cuando se logra obtener un pH por encima de 7,6. Esta característica se puede usar para diferenciar los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

Materiales

El medio comúnmente usado es el agar citrato de Simmons, disponible comercialmente. Se disuelve la cantidad necesaria en agua destilada; se dispensan ml en tubos con tapa a rosca y se esteriliza en autoclave a 121 °C, durante 15 minutos. Se deja enfriar en forma de estría. El medio es estable por 3 meses.

Rotular los tubos y guardar en heladera. Si se observa un cambio de color no usar.

Procedimiento

- A. Inocular material de una colonia estriando sobre la superficie del agar, sin punzar.
- B. Incubar a 37°C durante 24 h o hasta 4 días, registrando los resultados día por día.
- C. La tapa del tubo debe estar floja.

Resultados

Ensayo positivo: hay crecimiento con un color azul intenso en la estría.

Ensayo negativo: no hay crecimiento ni cambio de color (verde).

Control de Calidad

Klebsiella pneumoniae +

Escherichia coli –

Consideraciones

- A. Un crecimiento abundante sobre la estría pero sin cambio de color podría indicar un resultado positivo, sin embargo se debe repetir el ensayo con menos inóculo.
- B. Inocular sobre la superficie del agar, sin punzar porque la reacción requiere oxígeno.
- C. Para evitar falsos positivos, prevenir el arrastre de sustratos de otros medios.
- D. Con algunos miembros del género *Providencia*, a veces se obtienen resultados no muy netos. Repetir el ensayo e incubar a temperatura ambiente por 7 días.

Pruebas de descarboxilasas y arginina dihidrolasa

Fundamento

La descarboxilación es un proceso en el cual las descarboxilasas atacan el extremo carboxilo de los aminoácidos, formando la correspondiente amina. Los tres aminoácidos que se ensayan en la identificación de las enterobacterias son arginina, lisina y ornitina. La descarboxilación de lisina y ornitina da cadaverina y putrescina (diaminas), mientras que arginina da citrulina por

acción de una dihidrolasa. La prueba se debe acompañar con un tubo control que contiene el medio base sin aminoácido. Como la descarboxilación es una reacción anaeróbica, se debe cubrir el medio con una capa de aceite mineral estéril. El proceso ocurre en dos etapas: por fermentación de la glucosa se produce una acidificación del medio ($\text{pH} < 6,0$), apareciendo color amarillo. La acidificación es necesaria para que ocurra la descarboxilación. Este último proceso da lugar a la formación de las aminas que elevan el pH con el consiguiente viraje del indicador al color violeta.

La prueba de la lisina ayuda en la diferenciación de *Edwardsiella* (+) y *Salmonella* (+) de *Citrobacter* (-), de *Enterobacter aerogenes* (+), de *Enterobacter cloacae* (-) y de *Pantoea agglomerans* (-).

La prueba de ornitina ayuda a diferenciar *Klebsiella pneumoniae* (-), *Proteus mirabilis* (+) de *Proteus vulgaris* (-), *Morganella morganii* (+) de *Providencia rettgeri* (-), *Yersinia enterocolitica* (+) de *Yersinia pestis* y *Yersinia pseudotuberculosis* (-).

Materiales

El medio basal más comúnmente utilizado es el medio de descarboxilasa de Moeller. El medio está disponible comercialmente. Las concentraciones de aminoácidos a usar son: 1 % para la forma L y 2 % para la forma DL. Fraccionar el medio base en 4 porciones de 250 ml cada una. Agregar los aminoácidos a 3 porciones del medio. El pH se debe ajustar después de agregar el aminoácido y antes de esterilizar a 6 – 6,2. Fraccionar en volúmenes de 3 a 4 ml en tubos con tapa a rosca y autoclavar a 121 °C durante 10

minutos. El sustrato es estable por 3 meses. Rotular los tubos y guardar en heladera.

Procedimiento

- A. Tomar material con un ansa e inocular el tubo control y los tubos con los aminoácidos.
- B. Cubrir todos los tubos con una capa de vaselina estéril.
- C. Incubar a 37°C
- D. Efectuar las lecturas día por día hasta 4 días, registrando los resultados cada día.

Resultados

Ensayo positivo: medio turbio y púrpura a púrpura amarillento.

Ensayo negativo: color amarillo

Tubo control: permanece con su color original o se vuelve amarillo si la bacteria es fermentadora de glucosa (se debe ver turbiedad en el tubo)

Control de calidad

Bacteria	Arginina	Lisina	Ornitina

<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>Morganella morganii</i>	-	-	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	-	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	+	+
<i>Salmonella entérica</i> serovarTyphimurium	+	+	+
<i>Klebsiella</i> spp.	-	+	-

Consideraciones

- A. Inocular siempre un tubo control.
- B. Debe haber desarrollo para que el resultado sea válido.
- C. Si se observan capas de color amarillo y violeta, agitar suavemente el tubo antes de interpretar la reacción.
- D. Comparar todos los tubos positivos con el tubo control. Un color grisáceo puede indicar reducción del indicador más que formación de productos alcalinos. Se debe agregar más indicador antes de interpretar el resultado.
- E. Si la reacción es difícil de interpretar, comparar el tubo con un tubo sin inocular. Luego de 24 horas cualquier traza de color púrpura indica un resultado positivo.
- F. Si se usa el medio de Moeller, se debe incubar por lo menos 18 h antes de interpretar los resultados.
- G. Si no se agrega el aceite mineral, las reacciones se deben leer sólo a las 24 h.
- H. Un pequeño precipitado floculento en la ornitina no interfiere con su uso.

Prueba del malonato

Fundamento

El ensayo pone en evidencia la capacidad de las bacterias de utilizar malonato como fuente de carbono. Las cantidades mínimas de glucosa del medio, permiten el desarrollo de bacterias que no pueden usar malonato o sales de amonio, sin embargo esos microorganismos no pueden mantener un pH alcalino. La producción de ácido por la fermentación de la glucosa impide una posible alcalinización. Solamente los microorganismos que pueden usar simultáneamente malonato de sodio como fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno son capaces de ejercer una acción *buffer* produciendo hidróxido de sodio.

El aumento de la alcalinidad resultante hace que el azul de bromotimol cambie de verde a azul. Los microorganismos malonato negativos que fermentan glucosa hacen que el indicador cambie de verde a amarillo. La mayoría de las especies de *Enterobacter* y *Klebsiella* utilizan malonato de sodio. El ensayo también sirve para diferenciar distintas subespecies del género *Salmonella*.

Materiales

A. Medio

- Extracto de levadura 1,0 gr
- Sulfato de amonio 2,0 gr
- Fosfato dipotásico 0,6 gr
- Fosfato monopotásico 0,4 gr
- Cloruro de sodio 2,0 gr
- Malonato de sodio 3,0 gr
- Glucosa 0,25 gr
- Azul de bromotimol (1/500) 12,5 ml
- Agua destilada c.s.p. 1000 ml

Disolver en agua destilada, dispensar 3 ml en tubos con tapa a rosca y autoclavar a 121 °C durante 10 minutos. Enfriar antes de usar; el sustrato es estable por 2 a 3 meses. Rotular los tubos y guardar en heladera. Si hay cambio de color en el medio no usar.

Procedimiento

- A. Con ansa estéril tomar material e inocular el medio.
- B. Incubar a 37 °C por 24 a 48 h.
- C. Reincubar los tubos negativos hasta 4 días, registrando los resultados día por día.

Resultados

Ensayo positivo: reacción alcalina (azul).

Ensayo negativo: no hay cambio de color (verde).

Ensayo negativo: reacción ácida, sólo fermentación de glucosa (amarillo).

Control de Calidad

Enterobacter aerogenes +

Escherichia coli –

Consideraciones

- A. Algunos microorganismos malonato positivos producen una ligera alcalinidad, que hace la interpretación difícil. Cuando hay duda se debe comparar con un tubo sin inocular. Cualquier vestigio de color azul denota una prueba positiva luego de una incubación de 48 h.
- B. No se debe hacer una interpretación final negativa hasta no haber incubado los tubos durante 48 h.
- C. A veces es necesario agregar extracto de levadura y glucosa para estimular el crecimiento de algunas bacterias.
- D. Algunas cepas malonato negativas dan color amarillo por la fermentación de la glucosa solamente. Esto produce una disminución del pH y el viraje del indicador al amarillo.

Prueba del rojo de metilo

Fundamento

La prueba se usa para determinar la presencia de iones hidrógeno cuando un microorganismo fermenta glucosa. Todos los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* convierten glucosa en ácido pirúvico por el camino de Embden-Meyerhof. Las bacterias que metabolizan ácido pirúvico producen ácido y bajan el pH a menos de 4,4. Las que utilizan, en cambio, el camino del butilenglicol producen acetoina y butanodiol (diacetilo). El indicador del medio, rojo de metilo, es rojo a pH < 5,0 y amarillo a pH > 5,8. La prueba es útil para la diferenciación de *Escherichia coli* (rojo metilo positivo) de *Klebsiella* (rojo metilo negativo). La mayoría de las *Enterobacteriaceae* tienen uno u otro camino metabólico, pero raramente ambos.

Materiales

A. Preparación del medio

El medio (MRVP) está disponible comercialmente. Disolver en agua destilada, dispensar 5 ml en tubos con tapa a rosca y autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. El sustrato es estable por 2 a 3 meses. Rotular los tubos, indicando fecha de preparación y de expiración. Guardar en heladera.

B. Preparación del reactivo

Disolver 0,1 gr de rojo de metilo en 300 ml de etanol y diluir con 200 ml de agua destilada, para alcanzar un volumen total de 500 ml. El reactivo es estable por 1 año. Rotular y guardar en heladera.

Procedimiento

- A. Con un ansa estéril tomar material e inocular un tubo con caldo MRVP.
- B. Incubar a 35 °C durante un mínimo de 48 h.
- C. Transferir 2,5 ml de la suspensión a un tubo.
- D. Agregar 5 gotas del indicador y observar si hay cambio de color.

Resultados

Ensayo positivo: el reactivo permanece rojo.

Ensayo negativo: el reactivo se torna amarillo-naranja.

Si el resultado es negativo continuar la incubación por 24 horas más.

Control de Calidad

Escherichia coli +

Klebsiella pneumoniae –

Consideraciones

- A. Variaciones en la cantidad de peptona del medio puede afectar el resultado.
- B. Aumentando la concentración de glucosa en el medio no se acelera la reacción del rojo de metilo.
- C. No sobreinocular; el crecimiento bacteriano se inhibe cuando el inóculo es grande.
- D. Una incubación de 48 h es suficiente para la mayoría de los cultivos; pero el ensayo no se debe realizar con cultivos que tengan menos de 48h de incubación.

Prueba de Voges Proskauer

I. Fundamento

El piruvato es un intermediario en el metabolismo de la glucosa. A partir del ácido pirúvico un microorganismo puede seguir varios caminos. Algunos lo rompen para formar como productos finales ácidos láctico, acético o fórmico. Otros metabolizan el piruvato por el camino del butilenglicol para formar como productos finales acetoína (acetilmetilcarbinol) y 2,3-butanodiol (diacetilo). El ensayo de Voges-Proskauer (VP) detecta estos productos metabólicos. En presencia de oxígeno e KOH, la acetoína se oxida a diacetilo, que da un complejo rojo. La sensibilidad del ensayo se aumenta por el agregado de α -naftol antes del agregado de KOH.

II. Materiales

A. Preparación del medio

El medio está disponible comercialmente. Para la preparación del caldo MRVP, ver el procedimiento indicado para el test de rojo de metilo.

B. Preparación de solución de α -naftol

Disolver 5,0 gr de α -naftol en una pequeña cantidad de alcohol absoluto y luego llevar el volumen a 100 ml. La solución debe ser incolora. El

reactivo es estable por 1 año. Rotular indicando fecha de preparación y de expiración. Guardar en heladera en frascos color caramelo.

C. Preparación de la solución de KOH

Disolver los *pellets* de KOH en agua destilada y luego llevar el volumen final a 100 ml (trabajar sobre baño de agua fría para evitar recalentamiento). El reactivo es estable por 1 año. Rotular indicando fecha de preparación y de expiración.

III. Procedimiento

- A. Con un ansa estéril tomar material e inocular un tubo de caldo RM/VP.
- B. Incubar a 37 °C durante un mínimo de 48 h.
- C. Transferir 2,5 ml de la suspensión a otro tubo.
- D. Agregar 0,6 ml del reactivo de α -naftol.
- E. Agregar 0,2 ml del reactivo de KOH.
- F. Agitar el tubo y dejar descansar 10 a 15 minutos.
- G. Observar la formación de un color rosado a rojo.

IV. Resultados

Ensayo positivo: desarrollo de color rojo dentro de los 15 minutos.

Ensayo negativo: no hay desarrollo de color.

V. Control de Calidad

Klebsiella pneumoniae+

Escherichia coli -

VI. Consideraciones

- A. Cuando hay una incubación prolongada (más de 3 días) algunos microorganismos VP + pueden producir un aumento de la acidez del medio, dando reacciones positivas débiles o falsas reacciones negativas.
- B. La mayoría de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* dan reacciones opuestas entre el rojo de metilo y VP, sin embargo algunos organismos como *Hafnia alvei* pueden dar ambas reacciones positivas.
- C. Los reactivos se deben agregar en el orden indicado. Una inversión del orden puede dar un resultado positivo débil o un falso negativo.
- D. No se debe agregar KOH en exceso, porque se puede enmascarar una reacción positiva débil por la formación de un color cobrizo por la reacción del KOH con el α -naftol. No leer el ensayo después de 1 hora; puede aparecer una coloración cobriza dando un resultado falso positivo.

Prueba de la fenilalanina desaminasa

I. Fundamento

La prueba se basa en la desaminación de la fenilalanina para dar ácido fenilpirúvico por medio de la enzima. El ceto-ácido fenilpirúvico reacciona con el cloruro férrico para formar un compuesto de color verde.

La actividad enzimática es característica de todas las especies de *Proteus*, *Morganella* y *Providencia*, y se usa para separar estos géneros de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

II. Materiales

A. Preparación del medio

El medio está disponible comercialmente. Disolver en agua destilada, dispensar 2,5 a 3,0 ml en tubos con tapa a rosca y autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. El pH se debe ajustar a 7,2. Enfriar el medio en forma de estría. Rotular los tubos y guardar en heladera. El sustrato es estable por 2 a 3 meses.

B. Solución de cloruro férrico

Cloruro férrico	12,0 g
Agua destilada	94,6 ml
Acido clorhídrico concentrado	5,4 ml

Disolver 12,0 g de cloruro férrico en 94,6 ml de agua destilada. Agregar suavemente el ácido clorhídrico (nunca agregar agua al ácido). Rotular, guardar a temperatura ambiente.

Descartar el reactivo cuando se obtiene una reacción débil o negativa con el microorganismo control.

III. Procedimiento

- A. Con un ansa estéril tomar material e inocular la superficie del agar.
- B. Incubar a 37 °C durante 18 - 24 h.
- C. Agregar 0,5 ml (5 gotas) de cloruro férrico sobre la superficie del agar.
- D. Observar desarrollo inmediato de color verde.

IV. Resultados

Ensayo positivo: desarrollo de un intenso color verde en el líquido de sinéresis y en el medio.

Ensayo negativo: el medio permanece amarillo.

V. Control de calidad

Enterobacter aerogenes –; *Escherichia coli* –

Proteus mirabilis +

Proteus vulgaris +

Providencia +

VI. Consideraciones

- A. Las reacciones positivas desaparecen dentro de los 10 minutos de agregado el reactivo
- B. El agregado posterior de reactivo regenera el color.
- C. No se puede usar extracto de carne o hidrolizado de proteína en lugar de extracto de levadura porque varía su contenido de fenilalanina.

Prueba de la ureasa

I. Fundamento

La urea es una diamida del ácido carbónico, cuya hidrólisis por acción de la ureasa da 2 moléculas de amoníaco. La ureasa es una enzima constitutiva que se sintetiza independientemente de la presencia o no de la urea. La prueba determina la capacidad de la bacteria de desdoblar la urea, con la consiguiente alcalinización del medio.

Es una actividad característica de especies de *Proteus* y se usa para diferenciar *Klebsiella* (+) de *Escherichia coli* (-) y *Yersinia pseudotuberculosis* (+) de *Yersinia pestis* (-)

II. Materiales

El medio base está disponible comercialmente, es el medio base de urea de Christensen. Disolver el medio en agua destilada y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar a 50 °C y agregar 5 ml de una solución de urea al (40 %) por cada 100 ml de medio. Mezclar y fraccionar en volúmenes de 2,5 ml en tubos estériles. Guardar en heladera. La urea se pesa asépticamente, se disuelve en agua y se calienta a 70 °C durante 20 minutos, se guarda en frascos estériles con cloroformo (igual que para los azúcares).

III. Procedimiento

- A. Con un ansa estéril se toma abundante material y se inocular por punción
- B. Se incuba a 37 °C y se efectúan lecturas a las 2, 4, 6 y 18 h. Los tubos negativos se observan diariamente por 4 a 7 días para detectar reacciones

tardías que dan ciertos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, registrando los resultados día por día.

IV. Resultados

Ensayo positivo: aparición de color rojo en el medio por una alcalinización del mismo.

Ensayo negativo: no hay cambio de color.

V. Control de Calidad

Enterobacter aerogenes –

Escherichia coli –

Proteus vulgaris +

VI. Consideraciones

Las especies de *Proteus* dan una reacción positiva en muy corto tiempo. *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae* pueden dar una reacción positiva entre las 24 y 48 h.

Prueba del mucato

I. Principio

Se utiliza para determinar la capacidad de los microorganismos de metabolizar el ácido mónico. Es útil para diferenciar *Escherichia coli* de *Shigella* spp.

II. Materiales

Bactopeptona	1,0 g
Acido mónico	1,0 g
Azul de bromotimol 1/500	1,8 ml
NaOH 4N	1,2 ml

Pesar el ácido mónico y disolver en 80 ml de agua destilada Colocar el recipiente sobre un agitador magnético y agregar 1,2 ml de NaOH 4N aproximadamente (para 100 ml de solución se debe agregar 2,0-2,5 ml de NaOH 4N gota a gota), hasta virar el color amarillo de la solución al azul-verdoso; este color debe persistir durante 5 minutos de agitación. El agregado del álcali es para transformar el ácido mónico poco soluble en la sal soluble, mucato de sodio. A continuación agregar 1,0 g de bactopeptona, 8 ml de azul de bromotimol y 15,0 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7,4 por medio de NaOH 0,1N o HCl 0,1N, si se ha pasado el pH. Esterilizar por filtración y fraccionar en forma estéril en volúmenes de 3 ml por tubo. Guardar en heladera.

Procedimiento

Tomar material con un ansa estéril e inocular un tubo con mucato.
Incubar a 37°C durante 48 h, realizando lecturas a las 24 horas.

Resultados

Ensayo positivo: viraje del color al amarillo o amarillo verdoso.

Ensayo negativo: no hay cambio de color el medio permanece azul verdoso.

Control de Calidad

Cepas mucato (+): *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*

Cepas mucato (-): *Proteus vulgaris*, *Shigella* spp.

Prueba de la DNasa.

El agar DNA se dispone en cápsulas de Petri. Se efectúa una estría con la bacteria a ensayar sobre la superficie del medio. Se deja incubar una noche a 25°C. Luego se vuelca sobre la superficie desarmada una solución de HCl 1N.

Prueba positiva: se observa un halo transparente alrededor de la estría (degradación del ADN)

Prueba negativa: se observa todo el medio turbio, inclusive alrededor de la estría

Prueba no interpretable: no se observa desarrollo visible de la bacteria en la estría o no se observa turbiedad en ninguna zona de la placa.

Control de Calidad

Cepa DNasa (+): *Serratia marcescens*

Cepa DNasa (-): *Escherichia coli* ATCC 25922

Prueba de utilización del acetato

El agar acetato es un medio desarrollado para verificar la capacidad de ciertos microorganismos de utilizar acetato como única fuente de carbono.

Preparación del medio

Pesar las cantidades exactamente siguiendo las indicaciones del prospecto

[*Acetate differential agar* (Difco): 8,8g]

Rehidratar con 300 ml de agua destilada

Calentar suavemente hasta disolución

Distribuir aproximadamente 3 ml por tubo de hemólisis

Esterilización en autoclave 121° durante 15 minutos

Dejar que el medio se solidifique en pico de flauta

El medio preparado es de color verde.

Inoculación

Este medio se inocula por estrías en el pico de flauta

Interpretación de los resultados

Reacción positiva: viraje a azul del medio.

Reacción negativa: el medio permanece sin cambios.

Control de calidad

Control de esterilidad: Incubar a 37°C durante toda la noche. Verificar ausencia de desarrollo.

Control de desarrollo

Control positivo: *Escherichia coli* ATCC25922: buen crecimiento y viraje a azul.

Control negativo: *Shigella* sp: ausencia de crecimiento y no viraje del indicador. Permanece de color verde

Lopardo, Horacio Ángel

Manual de microbiología clínica de la Asociación Argentina de Microbiología :
enterobacterias / Horacio Ángel Lopardo ; Silvia Predari ; Carlos Vay. - 1a ed. -
Ciudad Autónoma de Buenos Aires : Asociación Argentina de Microbiología,
2016.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga
ISBN 978-987-26716-8-6

1. Bacteriología. I. Predari, Silvia II. Vay, Carlos III. Título
CDD 616.01

