



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**FORMAS L. UN NUEVO CONCEPTO SOBRE
LA ETIOLOGIA DE INFECCIONES EN
TRACTO URINARIO**

**TRABAJO MONOGRAFICO
DE ACTUALIZACION MANCOMUNADO**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N :

GRACIELA ELIZABETH LINARES OVIEDO

IDALIA RODRIGUEZ GARZA



1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I N D I C E

Pág.

INTRODUCCION

OBJETIVOS

I.- GENERALIDADES

1.1	Antecedentes Históricos	1
1.2	Estructura y composición de la pared celular	3
1.3	Definición y terminología	7
1.4	Características generales de formas L y diferencias con protoplasto, esferoplasto, micoplasmas y variantes de fase transicional	8
1.4.1	Esferoplastos	9
1.4.2	Protoplastos	10
1.4.3	Variantes de fase transicional	12
1.4.4	Micoplasmas	12
1.4.5	Formas L	15
1.4.6	Morfología colonial de las formas L	18
1.5	Tipos de formas L	22
1.6	Inducción y reversión	23
1.6.1	Inductores que impiden la síntesis de la pared celular	24
1.6.2	Inductores que actúan sobre la pared celular ya formada	28
1.6.3	Reversión de formas L bacterianas	33

	Pág.	
1.7	Condiciones de cultivo	34
1.8	Falsos positivos	36
1.9	Identificación	38
1.10	Reproducción	40
1.11	Genética	42
1.12	Capacidad patógena de las formas L	43
II.-	ENFERMEDADES DEL TRACTO URINARIO	
2.1	Anatomía y fisiología del sistema urinario	55
2.2	Infecciones urinarias	58
2.3	Factores defensivos del organismo	59
2.4	Factores predisponentes	61
2.5	Factores importantes en la patogé-- nesis de las enfermedades urinarias	63
2.5.1	Edad y Sexo	63
2.5.2	Embarazo	64
2.5.3	Bacteriuria en el varón	65
2.5.4	Obstrucciones	65
2.5.5	Reflujo vesicouretral	66
2.5.6	Instrumentación	66
2.6	Vías de infección	67
2.7	Clasificación de los padecimientos renales de acuerdo a la región - - afectada	71
2.7.1	Pielonefritis	71

2.7.2	Glomerulonefritis	72
2.7.3	Pielitis	73
III.-	ETIOLOGIA DE INFECCIONES RENALES CAUSADAS POR FORMAS L	
3.1	Agentes inductores de formas L en riñón	74
3.2	Cuadro clínico de la pielonefritis	76
3.3	Condiciones que favorecen la cronicidad	78
3.4	Presencia de microorganismos en fase L en infecciones renales	80
IV.-	SENSIBILIDAD DE LAS FORMAS L Y POSIBLE TERAPIA EN PADECIMIENTOS RENALES	
4.1	Antibióticos efectivos contra las formas L	85
4.2	Terapia combinada	86
V.-	DIAGNOSTICO CLINICO	89
5.1	Etapas necesarias para la obtención de un diagnóstico clínico y de laboratorio de una enfermedad infecciosa	90
5.2	Sugerencia de una técnica a seguir para la investigación de formas L	91
5.2.1	Toma de muestra	91
5.2.2	Transporte y conservación de la orina	97
5.2.3	Métodos directos adecuados para localizar una infección urinaria	97

	Pág.
5.2.3.1 Biopsia renal	98
5.2.3.2 Cateterización uretral	98
5.2.3.3 Técnica de Fairley, Bond, Brown y Habersberg o del lavado vesical	98
5.2.4 Métodos indirectos	100
5.2.4.1 Prueba de concentración renal	100
5.2.4.2 Importancia del serotipo del <u>mi</u> croorganismo infectante	100
5.2.4.3 Respuesta de anticuerpos al <u>mi</u> - croorganismo infectante	100
5.2.4.4 Excreción de enzimas urinarias	101
5.2.4.5 Función glomerular	101
5.2.4.6 Presencia de antígeno K	101
5.2.5 Criterios de Kass	103
5.2.5.1 Criterios de bacteriuria signi- ficativa	104
5.2.6 Metodología	104
D I S C U S I O N	108
C O N C L U S I O N E S	111
A N E X O	112
B I B L I O G R A F I A	116

INTRODUCCION

Las enfermedades del tracto urinario y, la pielonefritis en particular, representan un serio problema en lo que respecta a su etiología y su tendencia a la cronicidad debido a una terapia inadecuada.

A la luz de los conocimientos actuales sobre las formas L, es posible dar una explicación más racional al aparente aumento de las enfermedades crónicas infecciosas que se han venido observando desde 1935, fecha en que aparecieron los primeros antraxínicos.

Se ha demostrado que los agentes patógenos bacterianos cuando invaden a un huésped, ponen en acción una serie de mecanismos de defensa capaces de remover por medio de la fagocitosis y lisis a los agentes infecciosos; sin embargo, en una fase previa a la lisis, las bacterias ya desprovistas de pared celular por acción enzimática, anticuerpos y elementos inmunológicos inespecíficos del suero, adquieren resistencia a su destrucción final, dando por resultado la presencia de formas bacterianas atípicas (FBA), que en estas condiciones adoptan características propias que las hacen diferentes a las bacterias de morfología normal característica: imposibilidad para crecer en los medios de cultivo tradicionales y resistencia a la acción de antibióticos que actúan sobre la síntesis de la pared celular.

Estos microorganismos atípicos llamados generalmente protoplastos, esferoplastos o formas L, han sido objeto de investigación intensa en los años recientes, debido a que son de un interés biológico extremo y porque algunas evidencias sugieren que pueden tener un importante papel como agentes etiológicos de padecimientos crónicos.

Desde el punto de vista de la capacidad de un determinado microorganismo para ser productor de un proceso patológico y de acuerdo a los sitios de donde se les ha aislado se dividen en: Procesos abscedales y osteomielíticos; infecciones estreptocócicas; padecimientos neurológicos e infecciones urinarias.

Estudios previos demuestran la presencia de FBA en enfermedades humanas, sugiriendo que su presencia no es producto del azar, sino que más bien contribuyen a mantener una situación de actividad, o bien, como en el caso de pielonefritis y otros padecimientos infecciosos, son responsables de su cronicidad.

Cada vez con mayor frecuencia se presenta el caso de pacientes que a pesar de estar recibiendo una terapia adecuada e incluso masiva de antibióticos de diferentes espectros, no presentan modificación favorable del cuadro clínico, presentándose elevaciones térmicas de consideración. En estos casos el enfoque ha sido buscar el posible mecanismo que perpetúa el proceso infeccioso, dirigiendo la atención hacia los microorganis--

mos atípicos y en particular a las formas I por su caracterís-
ticas especiales detalladas en los capítulos respectivos.

OBJETIVOS:

- 1) Despertar el interés de microbiólogos, médicos generales y urólogos, por conocer el comportamiento fisiológico de la fase-L bacteriana, así como el papel que desempeñan en los procesos patológicos del tracto urinario.
- 2) Proponer una técnica auxiliar en el diagnóstico de enfermedades del tracto urinario para aislar e identificar formas-L como posible agente causal.
- 3) Proponer una posible terapia antimicrobiana para evitar la cronicidad de las pielonefritis tomando en consideración la sensibilidad de la forma bacteriana original y su forma L.
- 4) Dar una explicación más convincente del aumento de los padecimientos infecciosos crónicos urinarios.

CAPITULO I

GENERALIDADES

1.1 Antecedentes históricos

Poco después de la aparición de los antibióticos (1934) se ha observado un aumento de las enfermedades crónicas infecciosas; ésto condujo a un mundo ignorado hasta antes de que Klineberger Nobel cultivara por primera vez una forma especial de - - Streptobacillus moniliformis que más tarde denominó "L" (del Instituto Lister); es de hacer notar que la autora pensó que se trataba de una simbiosis entre la forma normal o vegetativa de la bacteria con un Mycoplasma, observando después que - las colonias "L" de este bacilo estaban formadas solo por organismos pleomórficos y su forma original (9, 17, 25, 29, 60). Dienes y Edsall comprobaron más tarde esta última aseveración, logrando la reversión de estas formas a los bacilos originales de los que provenían (26, 31).

Este descubrimiento de la autora se debe a las siguientes coincidencias: Tanto Mycoplasma como Streptobacillus moniliformis se encuentran en forma natural en la rata y ambos requieren de suero en su medio de cultivo; tanto Mycoplasma como la forma L requieren del microscópio para detectar sus colonias y sus características similares; Streptobacillus moniliformis es una - de las pocas especies bacterianas en las que la fase L ocurre

espontáneamente y, por otra parte, esta fase L no necesita de una protecci3n osm3tica especial en el medio. Por mucho tiempo el estudio de las formas L dependi3 de las investigaciones de las pocas especies que dan lugar a las variedades L en forma espontánea (23, 45, 51, 58).

Mattman ha cultivado formas L de pacientes con procesos sepi c3micos. Estos pacientes no respondieron al tratamiento con antibi3ticos, presentando hemocultivos reiteradamente negativos en los medios ordinarios (48, 78).

Guze y Kalamanson demostraron formas L en riñones de ratas - con infecciones hemat3genas que produjeron pielonefritis por enterococo. Tratando a las ratas previamente con penicilina, la bacteria fue erradicada por el antibi3tico, lo cual se demostr3 por cultivos en medios ordinarios, al cultivar en medios especiales se lograron obtener formas L y posteriormente revertirlas a su forma original.

Fueron necesarios dos descubrimientos para hacer el estudio de las formas L más manejable: El primero fue que la penicilina podía separar un desarrollo mixto de formas L y bacterias por medio de la eliminaci3n de estas últimas; ésto, adem as indujo a la fase bacteriana a crecer en su forma L, el segundo descubrimiento fué el reconocer la necesidad que tiene un microorganismo carente de pared celular rígida, de una protecci3n osm3tica determinada. A partir de estos dos descubri

mientos, un gran número de especies bacterianas se han inducido y estudiado en su forma L.

1.2 Estructura y composición de la pared celular:

Los componentes de la pared celular son especialmente importantes en el campo de la Medicina. Las macromoléculas de superficie (antígenos) son las que determinan las interacciones que tienen lugar entre las bacterias y los mecanismos de defensa del huésped, la identificación serológica de los antígenos es típica en la bacteriología diagnóstica; por otra parte, muchos antibióticos actúan sobre los procesos de biosíntesis de la pared celular.

La coloración de Gram permite clasificar a las bacterias en dos grandes grupos, que se diferencian entre sí por su capacidad para retener un colorante básico después de haber sido fijadas con I_2 . Ello se debe a importantes diferencias estructurales en la pared celular, que se han demostrado tanto mediante estudios de microscopía electrónica como por análisis químicos de dichas paredes.

Las bacterias Gram positivas poseen únicamente dos cubiertas, mientras que los microorganismos Gram negativos presentan tres (25).

Las primeras tienen una pared celular compuesta por:

1) El 50 - 90% de peptidoglucano (también llamado glucopépti-

do o mureína).

2) Aproximadamente un 10% de cadenas accesorias formadas por ácidos teicoicos (glicerolfosfato y ribitolfosfato) que se hallan unidas en forma covalente a la superficie externa de la célula.

Las bacterias Gram negativas tienen como componentes de su pared celular una pequeña capa de peptidoglucano, del mismo que se encuentra en las células Gram positivas; sin embargo, la cantidad de este compuesto en las Gram negativas fluctúa entre 5-10%, sin que se observe la presencia de ácido teicoico; el resto de la pared está compuesto por lípidos (48, 106).

Una característica universal de la pared celular bacteriana es la presencia de un peptidoglucano típico, o polímero de muramilpéptido, el cual es el principal factor que determina la rigidez del microorganismo. Por lo tanto, las enzimas que degradan al peptidoglucano y agentes microbianos que inhiben su síntesis, pueden causar la formación de esferoplastos y formas L bajo condiciones adecuadas.

Una cadena lineal de polisacárido que consiste en residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina alternándose, unidos por enlaces beta-1, 4, forman la columna vertebral del polímero. Muchos de los residuos de ácido N-acetilmurámico se enlazan a péptidos cortos (generalmente tetrapéptidos), comúnmente contienen L y D-alanina, ácido D-glutámico y un aminoácido

do dibásico tal como L-lisina o uno de los isómeros del ácido diamino-pimélico. Las subunidades del péptido están entrelazadas; la naturaleza y extensión de estos enlazamientos varían entre las especies. La dureza y rigidez del piperoglucano se debe también, en parte, a otras características: los enlaces de tipo beta-1,4 hacen que la cadena de polisacáridos resulte especialmente compacta y resistente; además, los polímeros sintéticos formados por aminoácidos D y L, dispuestos de forma alterna, son más resistentes que los constituídos por un único tipo de monómero.

Los ácidos teicoicos son polímeros que pueden ser, tanto una cadena de residuos de ribitol como de glicerina, con enlaces fosfo-diéster. Los ácidos teicoicos son importantes antígenos de superficie comparables a los lipopolisacáridos de los microorganismos Gram negativos pero su composición es más simple.

La longitud de sus cadenas es variable, pudiendo alcanzar hasta los 30 residuos. Sin embargo, es posible que las preparaciones que se han estudiado se hallan degradadas en parte, ya que los ácidos teicoicos se hidrolizan con facilidad. A estas cadenas pueden unirse diversos substituyentes (azúcares, aminoazúcares, colina y D-alanina), que actúan como determinantes antigénicos específicos. Los ácidos teicoicos se encuentran situados en la superficie externa de la célula, ya que en las células intactas reaccionan con los anticuerpos. Las numero-

Las posibilidades de sustitución permiten la existencia de un gran número de antígenos, incluso dentro de una misma especie.

El lipopolisacárido se conoce también como endotoxina, ya que es un producto tóxico que se halla unido íntimamente a la célula, está constituido por dos fracciones: el lípido A (que mantiene su toxicidad) y un polisacárido (del que depende la especificidad antigénica). El lípido A parece ser indispensable para la cubierta celular, ya que hasta el momento no se han podido aislar mutantes que carezcan de él. Generalmente el lípido A es siempre el mismo, mientras que el polisacárido es muy variable y da lugar a los centenares de Antígenos O -- que aparecen en las distintas cepas. Estos antígenos poseen una enorme importancia diagnóstica. El lípido A generalmente está formado por una cadena de beta-1,6- D-glucosaminadisacárido, en forma de unidades enlazadas por puentes 1,4'- pirofosfato y con todos sus grupos hidroxilo sustituidos. Uno de los sustituyentes es el polisacárido del lipopolisacárido; todos los demás son ácidos grasos de cadena larga. Dado que cada disacárido posee 5 ácidos grasos y 2 fosfatos, este material se comporta como un fosfolípido. El polisacárido se compone a su vez de dos fracciones: El núcleo que contiene una amplia variedad de azúcares y las cadenas laterales específicas, cada una de las cuales contiene la misma secuencia repeti

da en la que la subunidad es un trisacárido lineal o un tetra o pentasacárido ramificado. La longitud de las cadenas es variable (incluso en un mismo microorganismo), y alcanza hasta 25 unidades repetidas. Así pues, el antígeno O representa el aspecto de una masa de vibrisas de longitud variable, cada una de ellas unida a través de una cadena nuclear, al lípido A, que se encuentra en la membrana externa (25, 60, 117).

1.3 Definición y terminología:

La experimentación con las variantes microbianas de pared celular defectuosa, se han entorpecido por la deficiencia de definiciones aceptables para las diferentes fases de la pared defectuosa de la bacteria y a la carencia de una evaluación crítica de los diseños experimentales adecuados en el estudio de esos microorganismos (81).

La mayoría de las bacterias con pared celular dañada pueden experimentar marcados cambios morfológicos y fisiológicos y pueden existir por lo menos 4 fases:

- a) La fase protoplástica
- b) La fase esferoplástica
- c) La fase de transición
- d) La fase I

Cada una diferente de las otras y de la fase clásica bacteriana. El uso continuo de términos para las diferentes fases co

no si los términos fueran intercambiables, obscurece las diferencias reconocibles, resumidas en las definiciones (81).

Una definición para las formas L podría ser la siguiente:

Las formas L no son bacterias ordinarias, con daño en la pared celular, sino mutantes que no forman pared celular y pueden seleccionarse a fondo por un medio ambiente especial, son delicadas y frágiles y, sobre todo, tienen la capacidad de multiplicarse. Tienen como característica colonial la similitud a un huevo frito estrellado, con una porción central lisa profundamente encajonada en el medio y apuntamiento de formas redondas y en zonas periferias superficiales con más formas largas irregulares y cimentadas (69, 106).

Estas formas L pueden presentarse espontáneamente (9) en un cultivo de bacterias por acción de enzimas autolíticas (45) o puede ser inducida por varios agentes como penicilina, lisozima, etc.

1.4 Características generales de formas L y diferencias con protoplasto, esferoplasto, micoplasmas y variantes de fase transicional.

Se han empleado muchos términos que hacen referencia a bacterias atípicas de pared celular deficiente, para describir un tipo de microorganismo y un término simple tal como protoplasma. Estos términos han sido utilizados en las diferentes pu-

publicaciones con referencia a tipos diferentes de microorganismos, dando como resultado una gran confusión. Lo ideal sería una nomenclatura estándar, aplicada por todos los investigadores en este campo. En ausencia de esto, a continuación presentamos una síntesis de definiciones previas y las características generales de cada término.

1.4.1 Esferoplastos:

Son variantes microbianas de pared celular defectuosa, que difieren de los protoplastos primarios por tener superficies externas que contienen algún material de pared celular, tienen esencialmente los mismos requerimientos, características morfológicas y capacidad metabólica, que los protoplastos (76, 81, 85). La mayoría de las evidencias indican que los esferoplastos derivados in vitro no se reproducen en serie como esferoplastos (48, 81, 85). Pueden revertir a la fase clásica bacteriana o por transición a la fase L. En especial se encuentran con más frecuencia en cultivos pleomórficos de bacterias Gram negativas (19).

Cuando la capa mucopeptídica es un componente menor de la pared celular como en la mayoría de las bacterias Gram negativas, esta eliminación destruye la rigidez de la pared, pero deja más o menos intacta la otra capa lipoproteínica plástica y capas lipopolisacáridas y el cuerpo resultante es un esferoplasto.

Otra característica de los esferoplastos es que poseen menos antígenos somáticos que las células originales y son capaces de absorber bacteriófagos usualmente con una eficiencia reducida. La osmolaridad que requieren estos elementos es menor que la de los protoplastos (45).

Para la mayoría de los autores son formas de transición entre la forma vegetativa de una bacteria y su forma L, sin embargo, no conservan su capacidad de reproducción (48, 67).

1.4.2 Protoplastos:

Son microorganismos con pared celular defectuosa derivados artificialmente de bacterias Gram positivas, su superficie externa está libre de todos los constituyentes de la pared celular, son típicamente Gram negativos, esféricos, osmóticamente frágiles por lo que se requiere, para proteger a la célula del estallamiento, que el valor osmótico del medio ambiente sea el mismo que el de la célula, no se multiplican en medios artificiales y no son afectados por la penicilina (15, 16, 45, 76, 81).

Su tamaño es generalmente uniforme e igual, o más grande que la bacteria de la cual se derivaron (57, 81, 85). Adoptan morfología esférica en medios líquidos, ya que aún conservan su membrana citoplásmica. La estructura interna corresponde a la de la bacteria original con pequeñas variaciones, ya que en el momento en que se elimina la pared celular, se eliminan también

los mesosomas o estructuras semejantes a ellos. Los protoplastos carecen de receptores de bacteriófagos que poseen las células originales de las que se derivaron (38, 39, 45).

Cuando las células Gram positivas, se tratan con lisozima bajo condiciones de alta osmolaridad, la pared celular se desintegra y libera un cuerpo esférico osmóticamente frágil, circundado por una única membrana. Si la condición de osmolaridad se mantiene, los protoplastos son estables y tienen mayor capacidad biosintética que las células de las cuales se derivaron, incrementando su tamaño y peso seco, disminuyendo la división; eventualmente son lisados. La mayoría de las evidencias indican que no pueden reproducirse en serie como protoplastos (37, 45, 81, 85, 108). Microorganismos con estas características pero en los cuales la ausencia de todo el material de la pared celular no se ha establecido experimentalmente, se deberán designar como esferoplastos y no como protoplastos (15, 81, 85). Bajo condiciones especiales, algunos protoplastos pueden revertir a la clásica fase bacteriana; si la transición da lugar a la fase L no se llaman protoplastos sino variantes en fase L (66, 71, 81).

Originalmente se consideró que los protoplastos, en verdad eran incapaces de dividirse, pero después de intentar algunas divisiones pueden propagarse en medios sólidos y tanto protoplastos como esferoplastos producen colonias que son morfológicamente -

indistinguibles de las colonias de formas L. Por lo tanto, - un protoplasto o esferoplasto que puede dividirse, por consiguiente se clasifica como forma-L (45).

1.4.3 Variantes de fase transicional:

Son variantes microbianas con pared celular defectuosa, caracterizadas por la inestabilidad de la morfología celular, asociadas con una tendencia inherente a revertir a la fase vegetativa bacteriana (81, 110).

Los microorganismos en un medio de cultivo varían marcadamente en tamaño, forma, características de Gram, contenido de constituyentes en la pared celular, fragilidad osmótica y sensibilidad a la penicilina. La morfología colonial varía de paso a paso. Las variantes en la fase transicional difieren de las variantes en fase L, por la incapacidad de formación y propagación seriada de una colonia distintiva en agar. Pueden sufrir una conversión a variantes en fase L. La mayoría de las separaciones clínicas de variantes de pared celular defectuosa son probablemente variantes en la fase transicional (81).

1.4.4 Micoplasmas:

Los micoplasmas son los microorganismos de menor tamaño que se conocen y se diferencian de las bacterias en que carecen de pared celular. Sin duda alguna contienen la maquinaria macromo-

lecular mínima necesaria para su reproducción autónoma. Por esta razón y debido a que sus membranas son fácilmente accesibles, han despertado un gran interés entre los biólogos moleculares. Debido a que carecen de pared celular, los microorganismos del género Mycoplasma no se tiñen con los colorantes de Gram y resultan más plásticos y pleomórficos que las eubacterias. Con el colorante de Giemsa presentan un aspecto de pequeños cocos pleomórficos o de bacilos de escasa longitud y, en algunos casos, adoptan el aspecto de anillos huecos. Poseen una unidad esférica reproductiva que puede variar de 100 a 250 nm de diámetro de la cual surgen filamentos en los que se desarrollan los cuerpos reproductivos y se liberan por fragmentación. Están limitados por una membrana trilaminar presente solo en los procariotes y contienen esteroides de 75 a 100 Å de espesor.

En medio sólido los micoplasmas forman colonias transparentes de pequeño tamaño que, aún después de teñidas, son difíciles de detectar a menos que se use una lupa. La detección de las colonias debe hacerse mediante un microscopio óptico y utilizando un pequeño aumento. Las colonias típicas presentan un tamaño de 10 a 600 nm de diámetro y su aspecto es el de pequeñas estructuras redondeadas con una superficie granulosa y un punto central más oscuro. Este punto central que da a la colonia el aspecto de huevo frito estrellado, se debe a la exis-

tencia de una zona central de mayor crecimiento por debajo de la superficie del agar (quizá debido a que estas células, al hallarse entre las fibras del agar, se dividen con mayor facilidad). Para su crecimiento, la mayoría de los micoplasmas requieren un medio enriquecido, pero a pesar de carecer de pared celular, no es necesario que el medio posea una elevada presión osmótica. La mayoría de las especies requieren también un esteroide y una proteína sérica. La necesidad de que el medio contenga esteroides es extraordinariamente interesante, ya que éstos no forman parte de los nutrientes utilizados por las bacterias o por sus formas L. Aproximadamente contienen de 10 a 20% de su peso seco en forma de lípidos totales y, de esta proporción, un 50 a un 65% son lípidos no saponificables (probablemente esteroides).

Una diferencia importante entre Mycoplasma, formas L, proto- - plastos y esferoplastos bacterianos, es la cantidad de colesterol en la membrana. Pero algunas especies de Mycoplasma saprófitos no requieren o no contienen colesterol, aún cuando éste se omita en el medio. La incorporación de colesterol a la membrana hace al microorganismo sensible a los antibióticos poliénicos (nistatina, pimarcina). Las membranas celulares de las bacterias carecen de esteroides, y probablemente por ello, no son sensibles a los polienos. En general, los micoplasmas son sensibles a las tetraciclinas y a la kanamicina y resistentes

a las sulfamidas y, al carecer de pared celular, a la penicilina.

Los micoplasmas son más sensibles que las eubacterias a la acción letal del agua destilada, suero fisiológico y a agentes tensioactivos.

A diferencia de las formas L, los micoplasmas no revierten a ninguna forma bacteriana. Casi todos son más pequeños que las formas L y contienen menor cantidad de ADN que el establecido en el núcleo de una bacteria normal. Aunque la composición de bases del ADN de ambos fué casi idéntica, no se encontraron secuencias comunes de bases nucleotídicas.

El contenido de G - C de Mycoplasma es menor que el contenido de las especies bacterianas.

Una de las diferencias más notables entre Mycoplasma y la forma L es su filtrabilidad. La diferencia se debe al hecho de que los micoplasmas son pequeños, pero la filtrabilidad de la forma L es más probable que se deba a la deformación de las partículas reproductivas, las cuales no son más pequeñas que su fase bacteriana y debido a ésto se puede confundir con Mycoplasma (9, 23, 25, 32, 51).

1.4.5 Formas L

La fase L son variantes microbianas con pared celular defectuosa que pueden duplicarse seriadamente como células no rígidas, las que, en un medio sólido, producen colonias distintas com--

puestas de un crecimiento central y un crecimiento alrededor de ese centro dando la apariencia de un huevo frito estrellado (33).

Los microorganismos individuales varían de tamaño, desde cuerpos largos, más largos que la forma de la bacteria, a cuerpos pequeños, más pequeños que los virus. Son Gram negativos indiferentes a la penicilina y generalmente esféricos o pleomórficos. Además, algunas especies pueden requerir estabilización osmótica para un óptimo crecimiento in vitro, otras sobreviven a osmolaridades comparables a las del suero humano y a la exposición al agua destilada o desmineralizada (86, 88, 96).

Tanto las formas L como todas las bacterias con ausencia o pérdida parcial de su pared celular, tienen en común las siguientes características: Pérdida parcial o total de la pared celular, pleomorfismo, morfología colonial característica, fragilidad osmótica, filtrabilidad, no crecer en los medios de cultivo ordinarios y sí hacerlo en medios hipertónicos, tienen división celular desorganizada, todo esto sin que su genoma presente alguna modificación; sin embargo, las formas L se diferencian de las demás en que conservan la facultad de reproducirse (46, 63, 81, 90).

El término formas L se refiere solamente a la morfología distintiva de las colonias compuestas de las variantes en fase L. (7, 33).

Algunas variantes en fase L revierten a la fase bacteriana por acción de la sustancia que induce a la fase L (variantes inestables); algunas revierten únicamente bajo condiciones especiales (variantes relativamente estables fase L); algunas no revierten bajo ninguna condición (variantes estables fase L).

La suma del material de la pared celular en las variantes fase en L, varía en gran medida (87, 108) y no necesariamente se correlaciona con la capacidad de revertir a la fase bacteriana (54, 81)

Es de hacer notar que las variantes en fase L: difieren químicamente de los protoplastos de la misma especie, pueden ser genéticamente más estables que los protoplastos o esferoplastos de las mismas especies, son capaces de responder seriadamente en agar en una colonia distintiva de la colonia en forma L, - mientras la variante en fase transicional no puede (57, 86, 92). Aunque las formas L muestran imposibilidad para la síntesis de la pared celular, conservan el resto de sus funciones intactas. Inmediatamente después de la inducción, la fase L crece mucho más lentamente que la fase bacteriana, pero su rápida adaptación en repetidas transferencias permite que las colonias L alcancen su máximo tamaño, tan rápido como lo hacen las colonias bacterianas. El tamaño absoluto de las colonias puede verse a simple vista después de una serie de resiembras (19, 23).

Recientemente reportaron estudios paralelos de ADN en Strepto-

coccus faecalis y su forma L estable, observando que el ADN de las formas L ha perdido del 4 al 6% de las secuencias polinucleotídicas presentes en la bacteria clásica original. Alternativamente, se requiere en forma probable, de alguna fracción de la pared celular que actúe como "cebador" para la síntesis de material nuevo para la pared celular (35).

La formación de protoplastos conduce a una pérdida de los mesosomas, y al resintetizar su pared celular, los recuperan. Las formas L bacterianas no poseen mesosomas o estructuras semejantes a los mesosomas normales (69).

1.4.6 Morfología colonial de las formas L:

Son células de forma variada que crecen formando colonias sumergidas en el agar, semejantes a las colonias de Mycoplasma. Cuando se depositan sobre un medio de cultivo sólido, sus corpúsculos elementales penetran entre los orificios que dejan entre sí las micelas del coloide de agar y se reproducen, formando una colonia en el interior del mismo, posteriormente siguen creciendo en la superficie formando un halo de crecimiento superficial que es menos denso, por lo que la colonia completa tiene la morfología de un huevo estrellado.

Las formas L recientemente inducidas rara vez desarrollan íntegramente como colonia clásica, frecuentemente se requiere de una serie de transferencias con el fin de tener un crecimiento

regular y confiable. Antes de la adaptación a un crecimiento sin complicaciones, exhibiendo morfoloía colonial fácilmente reconocible, es posible solo por la característica morfológica, mediante observaciones meticulosas y repetidas con el objetivo estereoscópico de inmersión, preferentemente de preparaciones teñidas.

Al inicio del desarrollo, cuando sólo algunos de los microorganismos se han multiplicado, es mayor la tendencia a crecer en largos cuerpos o filamentos, si no se toma en cuenta la característica principal de crecimiento de la fase L, que es la penetración en la superficie inoculada del agar, pueden confundirse fácilmente con los cuerpos largos producidos por bacterias de crecimiento pleomórfico que no penetran en el agar. En estudios con microscopía electrónica se aprecia la presencia de restos de la pared celular, en la periferia de los corpúsculos esféricos osmóticamente frágiles obtenidos de bacterias Gram negativas tratadas con penicilina o lisozima.

Observadas microscópicamente, las colonias de formas L pueden estar compuestas de muchos elementos altamente pleomórficos, diferenciando ambos en tamaño y forma, cada una de las cuales es tan limitada por una sola o doble membrana.

Dienes en 1967 distinguió tres elementos básicos:

- 1) El cuerpo largo
- 2) Los gránulos

3) El cuerpo elemental

Cada uno de estos elementos muestran gran variación en tamaño. El rango de los cuerpos largos es de 1 a 50 nm y pueden contener citoplasma homogéneo o ser altamente vacuolado. El rango en tamaño de los gránulos está entre 0.1 a 1 nm y pueden estar dentro o fuera de los cuerpos largos. Los corpúsculos elementales tienen un diámetro de 0.05 a 0.5 nm. Las electromicrofotografías confirman la existencia de estos tres elementos básicos (1).

Estudios hechos con filtros de porosidad variables para medir el diámetro de las pequeñas unidades viables (Klieneberger-Nobel 1956, Klieneberger et al 1956, Tulanse y Lavillaureix - - 1958, Williams 1963, Van Bovan et al 1968) dan una amplia variedad estimada, con rangos de 0.1 a 0.2 nm para formas L de Proteus (Tulanse Lavillaureix 1958) a 0.7 nm o mayores para formas L de Staphylococcus (64).

Los elementos de las formas L son cuerpos plásticos y pueden ser capaces de pasar a través del poro de un filtro por deformación (108).

Van Boren y sus colaboradores en 1968 estimaron que los tamaños de las pequeñas unidades viables en formas L de Streptococcus se presentan entre 0.46 y 0.65 nm, pero cuando el filtro fué examinado por microscopía de contraste de fases, fué observado que contenía unos pocos cuerpos largos con diámetro de --

0.8 a 1.7 nm. Estudios microscópicos del desarrollo de formas L de V-cholerae (45), Proteus sp., Staphylococcus y Formas L de Streptococcus llegan a la conclusión de que los cuerpos pequeños no son viables, pero que la mayoría de los cuerpos largos son capaces de multiplicarse. La evidencia favorece la opinión de que los cuerpos largos con un diámetro aproximadamente de 0.7 nm o más son las unidades viables y que ocurre crecimiento desarrollando por fisión ineficaz de estos cuerpos (45). Algunos trabajos (1, 5, 53, 64) consideran que los cuerpos largos son entidades celulares vivientes y probablemente una etapa necesaria en el ciclo de crecimiento de las formas L, siendo una característica única asociada con el crecimiento de formas L y Mycoplasma.

Los cuerpos largos pueden aparecer envueltos por una membrana limitante estructuralmente estable. En un estudio sobre estas estructuras se observó que pueden dividirse en 2 ó 3 cuerpos más pequeños, cada uno de los cuales retiene las características de fluorescencia en la tinción en los bordes de las partes del cuerpo. Difícilmente se detectan con el microscopio de contraste de fases, se observan claramente por microscopía de fluorescencia ultravioleta, de especímenes tratados con fluorocromos (64).

Otros estudios revelan que estos cuerpos se desarrollan e incrementan su tamaño conforme lo hace la porción central de la

colonia desarrollada (74); estudios de micromanipulación, demostraron su naturaleza elástica.

La observación de cuerpos largos de Streptobacillus moniliformis revelaron cuerpos granulares dentro de algunos cuerpos largos.

Las estructuras granulares pequeñas muestran unidades mínimas reproductivas observadas dentro de algunos de los cuerpos largos por microscopía de fase, fluorescencia y por microscopio electrónico. Estas estructuras probablemente quedan atrapadas dentro de los cuerpos largos durante la formación de los mismos en el cultivo, siendo como un saco de protección lipoidal- definido por la mínima unidad reproductiva del cultivo (64)

1.5 Tipos de Formas L:

La mayoría de los investigadores en este campo dividen a las formas L en dos clases: estables e inestables. Las segundas revierten a la forma original cuando se remueve del medio de cultivo el agente inhibidor de la pared celular.

Las formas estables no revierten cuando se transfieren a un medio libre de inductor; estas diferencias son consecuencia de la estructura de los dos tipos de formas L. La estable solo tiene una membrana individual en su superficie, la inestable tiene dos membranas periféricas, la otra membrana probablemente representa pared celular degradada sobre la membrana celu-

lar inerte, estas observaciones están acordes con los estudios bioquímicos, ya que en las formas inestables se han demostrado cantidades variables de constituyentes de la pared celular, -- ácido diaminopimélico y murámico; en las formas estables las -- cantidades de estos compuestos son muy pequeñas (25, 28, 35, -- 45, 51, 58, 105, 108).

1.6 Inducción y reversión:

La inducción y la reversión pueden representarse tal como un -- equilibrio dinámico;



Normalmente una población microbiana está en su fase bacteria-- na. La debilitación de la pared celular, además de condicio-- nes de cultivo inadecuadas, puede inducir a cierta proporción-- de las bacterias a crecer en la fase L. Bajo ciertas condicio-- nes, algunas bacterias en fase L pueden formar nuevamente una-- pared celular completa y rígida (23).

Mecanismos de inducción:

Se ha tratado de explicar el mecanismo de cada uno de los agen-- tes inductores proponiéndose dos métodos para tal efecto:

- I) Los que actúan sobre el crecimiento bacteriano impidiendo-- la síntesis de la pared celular.
- II) Los que actúan sobre la pared celular ya formada.

1.6.1 Inductores que impiden la síntesis de la pared celular:

Substancias específicas bloqueadoras como es el caso de los --
antibióticos:

1. Penicilinas: Inhiben la síntesis de la pared celular de los
microorganismos que contienen o forman poliglucanos, ya que
impiden la unión carboxil-etilpeptídica (40).

Las penicilinas interfieren con el enlace de las cadenas --
peptídicas del peptidoglucano (45, 81) porque actúan como -
análogas de D-alanina-D-alanina y posee el enlace peptídico
situado en el anillo del antibiótico, el cual corresponde -
al enlace que se rompe durante la reacción de transpeptida-
ción. Como resultado de esta reactividad, la penicilina ---
bloquea irreversiblemente la reacción que da lugar a la for-
mación de enlaces cruzados, probablemente debido a la --
formación de una enzima penicililoil estable, en lugar de la --
enzima normal de tipo peptidil, que es transitoria (25). -
De esta forma, las bacterias sensibles a la penicilina pue-
den ser inducidas a formar esferoplastos bajo la influencia
de la droga y muchos de ellos se reproducirán produciendo -
colonias L en el agar. Cuando la penicilina se elimina, --
las formas L generalmente revierten a su forma clásica bac-
teriana. Algunas veces, después de muchos pases en medios--
con penicilina, los microorganismos no revierten (Formas L

estables) (35, 54, 70).

Esto sugiere dos posibles explicaciones: que las enzimas responsables de la síntesis del peptidoglucano son inefectivas en presencia de penicilina por el hecho de que los microorganismos sinteticen enzimas extras, lo que da por resultado una desventaja selectiva, y la otra es que pueden seleccionarse mutantes defectuosas, al menos en una de las enzimas sintetizadoras del peptidoglucano.

Mecanismo de acción de la penicilina:

La biosíntesis del peptidoglucano se produce en 4 etapas:

- 1) Síntesis de precursores hidrosolubles;
- 2) Unión a un lípido de membrana, paso que va seguido de nuevas uniones;
- 3) Formación de polímeros lineales en la superficie externa de la membrana y
- 4) Formación de enlaces cruzados entre estos polímeros.

En esta última etapa actúa la penicilina.

El enlace cruzado se produce gracias a una reacción de transpeptidación, que es neutra desde el punto de vista energético; en esta reacción, un radical NH_2 libre desplaza a la D-alanina terminal de una cadena lateral próxima, liberando dicho residuo y formando un puente con la D-alanina subterminal; los precursores siguen polimerizando, pero al bloquearse la reacción dejan de establecerse enlaces cruzados.

En el esquema siguiente se presenta el nivel en el cual actúa la penicilina (25, 35). Fig. 1

2. Cefalosporinas: Son antibióticos semejantes a las penicilinas pero mucho menos potentes, su mecanismo de acción es similar al de la penicilina (25)

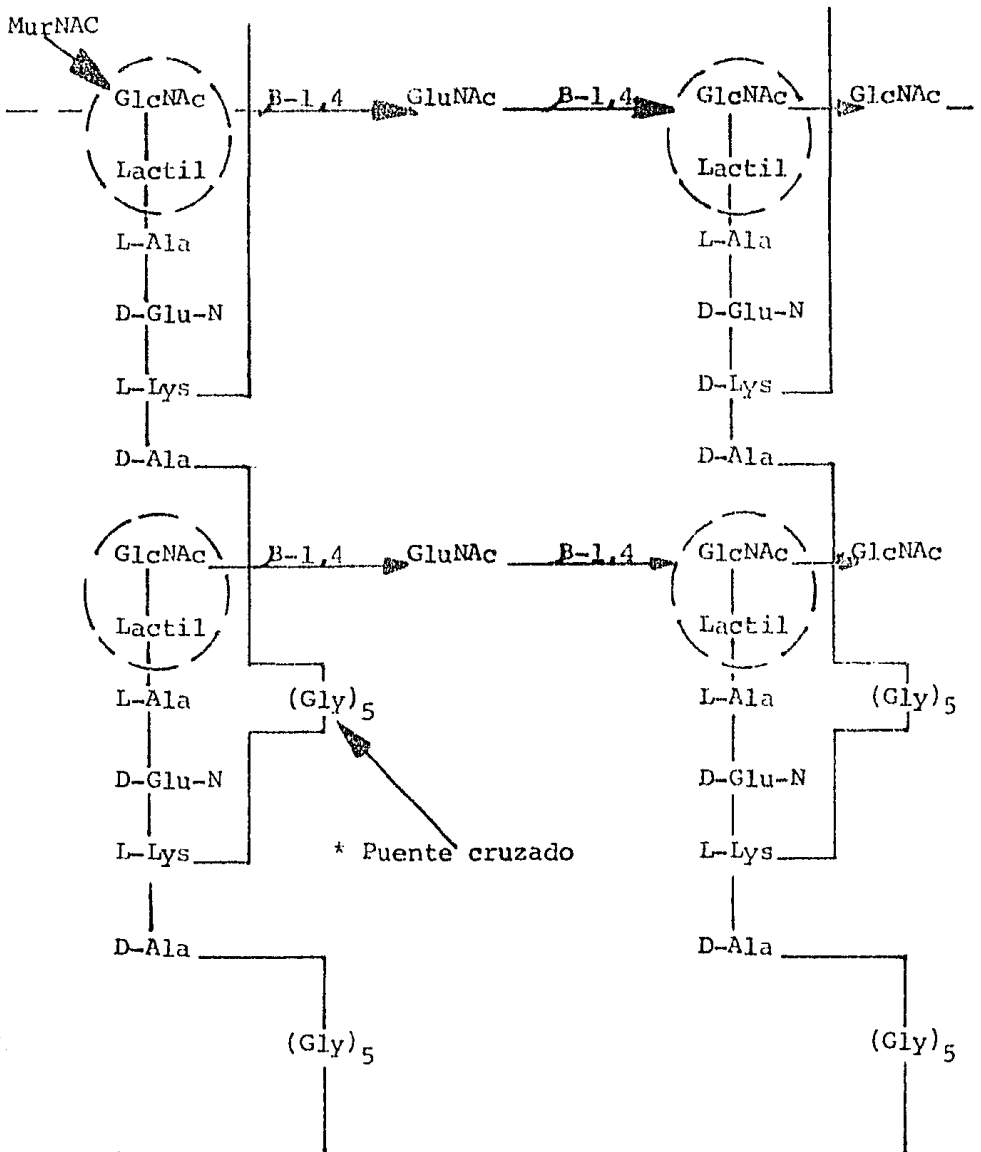
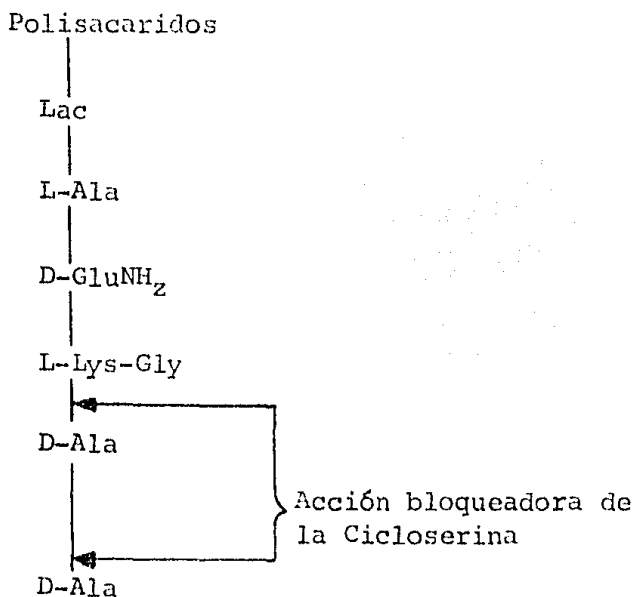


Fig. 1 (25).

* Acción bloqueadora de la penicilina.

3. **Cicloserina:** Es un análogo estructural de la D-alanina que bloquea dos reacciones sucesivas en las que interviene dicho metabolito, bloqueando la síntesis de las subunidades peptídicas (25).



4. Algunos autores reportan que otros antibióticos que actúan a nivel de la síntesis del peptidoglucano pueden inducir la formación de esferoplastos y formas L. Estos incluyen a la bacitracina, la cual interfiere con el metabolismo de un lípido intermediario esencial para la síntesis del peptidoglucano; la vancomicina y ristocetina, que aparentemente bloquean la síntesis del peptidoglucano por enlazamiento a la pared celular previniendo la adición de nuevas subunidades al polímero (34, 35, 104).

La privación de un nutriente especial como es el caso de formar *G* obtenidas de Escherichia coli, en el que, cuando se elimina del medio de cultivo el ácido diaminopimélico, da una mutante que requiere este aminoácido (19).

1.6.2 Inductores que actúan sobre la pared celular ya formada:

a) Lisozima: Los microorganismos Gram positivos son los más sensibles a la acción de esta enzima, debido a que contienen en su pared celular una gran cantidad de mucopolisacáridos o poliglucanos; químicamente está formado por dos - - - aceto - amido - azúcares, la 2-acetoamido-2-desoxi-3-O-(D-1-carboxietil)-D-Glucosa o ácido murámico y la 2-aceto-amido-2-desoxi-D-glucosa o acetil-2-glucosamina, en uniones - - beta-1,4. El grupo 3-O-(D-1-carboxietil) tiene en unión peptídica un tetrapéptido formado por L-alanina D-alanina, ácido D-glutámico y un diaminoácido, la L-lisina o ácido --diaminopimélico; en algunas especies bacterianas se encuentran con los antes mencionados, otros aminoácidos, glicina, L-treonina, ácido aspártico y residuos adicionados de L-alanina (40).

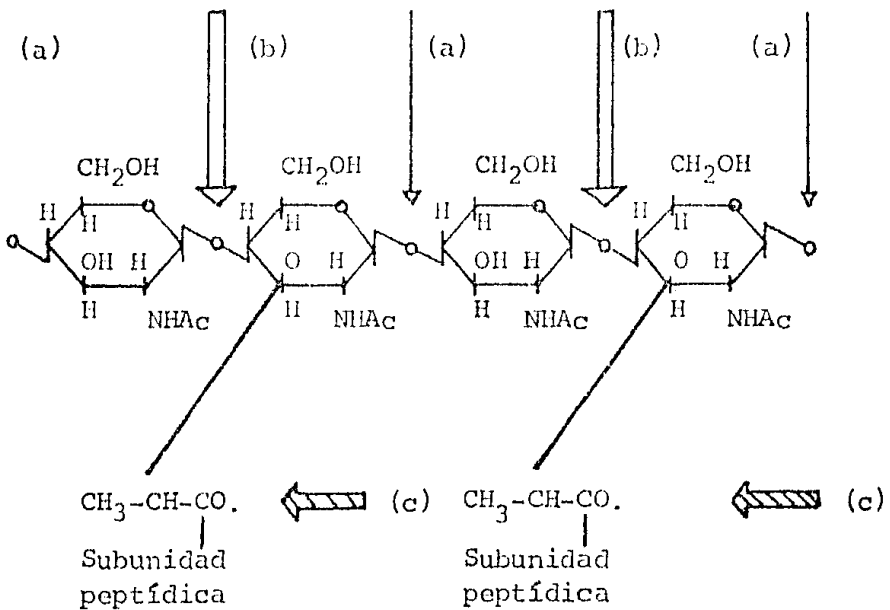
Cualquiera de los agentes que lisan la pared celular, como la lisozima, está formada por cualquiera de estas enzimas - que actúan en los lugares correspondientes.

a) La enzima Endo-N-acetilmuramidasa que actúa sobre la - -

unión beta-1-N-acetilmurámico y 4-N-acetil glucosamina.

b) La enzima Endo-N-acetilglucosaminidasa que actúa sobre la beta-1-N-acetilglucosamina y ácido 4-N-acetilmurámico.

c) La enzima N-acetil-muramil-L-alanina amidasa que actúa en la unión carboxietilpeptídica (17, 35).



Los microorganismos Gram negativos son poco sensibles a la acción de la lisozima y en general a los agentes que actúan sobre las poliglucanos, porque el mucopolisacárido sobre el cual actúa, está en las zonas profundas de la pared celular, en estos casos los cultivos son pretratados con polimixina, EDTA, lipasas o por la reacción inmunobactericida mediada por el sistema anticuerpo complemento, permitiendo a la en-

red celular (35).

Se ha observado por medio de microscopía electrónica, que los protoplastos, esferoplastos y formas L inducidos por lisozima, pierden los mesosomas y su eliminación permanente no solo puede causar incapacidad de sintetizar material de la pared celular, sino que también puede interferir en el proceso de división en las formas L estables, en las -- cuales es desorganizado y al azar (32).

Un fenómeno importante que explica la inducción de estas formas en el organismo, es la actividad combinada del sistema complemento y lisozima que pueden conducir a la lisis total de una bacteria o a la inducción de formas L (17,19,45).

Aunque el estudio del complemento se ha centrado principalmente en la lisis celular, los efectos fisiológicos más importantes del complemento activado se hallan en relación con las alteraciones celulares e hísticas que se producen durante los procesos inflamatorios, ya que muchas bacterias y probablemente muchos virus, no son sensibles a la acción lítica del complemento; tales efectos fisiológicos son el aumento de la permeabilidad capilar (actividad anafilotóxica), la migración dirigida (quimiotaxis), así como la adherencia de los complejos Ac-Ag-C a los leucocitos, plaquetas, etc., aumentando así su sensibilidad a la fagocitosis por parte de los leucocitos y de los macrófagos.

La actividad bactericida del leucocito se debe tanto a los componentes lisosómicos como a otros productos metabólicos. Un componente del gránulo lisosómico es la lisozima (mura-midasa), que es una aminopolisacaridasa capaz de hidrolizar los componentes mucopeptídicos de las bacterias susceptibles, haciéndolas sensibles a los choques osmóticos. Las bacterias Gram negativas que generalmente resisten a la lisozima, se convierten en sensibles por la acción de los anticuerpos junto con el complemento (18, 45, 58).

La presencia de anticuerpos específicos antibacterianos -- puede ser otra causa de inducción a formas L en el organismo, provocada por una reacción de tipo alérgica, dependiente de una alta concentración de anticuerpos como en el caso de la reacción de Arthus, cuya característica principal consiste en la formación en los tejidos, de agregados inmunes voluminosos que fijan complemento y atraen a los leucocitos polimorfonucleares: las enzimas lisosómicas liberadas por las células lesionan el tejido, dando lugar a una típica inflamación destructiva de los capilares (vasculitis) y, además, da lugar a la formación de esferoplastos o formas L (18, 25, 51).

b) Bacteriófagos: Algunos autores han descubierto que también se pueden inducir las formas L y esferoplastos por fagos que se unen a los receptores específicos de las bacte-

rias. La simple unión de la cola del fãgo, o de fantasmas de fago (cãpsides sin ADN), sin que exista expresi3n de los genes v3ricos, altera la permeabilidad de la membrana plasmãtica de la c3lula, produciendo cambios metab3licos como son la inhibici3n de la s3ntesis de prote3na y del ADN. Los cambios de la membrana y sus efectos metab3licos son reversibles en c3lulas infectadas por fagos de escasa multiplicidad; sin embargo, en c3lulas infectadas por fagos fantasmas, se produce una lisis celular sin multiplicaci3n v3rica.

En el proceso de liberaci3n tambi3n se ha observado la acci3n de la lisozima en el proceso l3tico de c3lulas infectadas por los fagos T de numeraci3n par, la cual se debe a los efectos de los productos de tres genes v3ricos. El gen T da lugar a un producto que favorece la lisis, afectando la membrana plasmãtica de las c3lulas y deteniendo el metabolismo celular; los genes r y S afectan a la membrana retardando la lisis. El acto final del proceso l3tico tiene como protagonista al producto del Gen e, la lisozima, que actúa sobre la pared celular despu3s de cruzar la membrana plasmãtica, previamente alterada por la acci3n de los demãs genes, si en esta etapa el proceso l3tico se detiene debido a condiciones espec3ficas, el resultado serã un esferoplasto o una forma L (25, 51, 60).

c) Colicinas: Se ha demostrado que las colicinas también producen esferoplastos y formas L. Las colicinas son proteínas responsables de un tipo especial de antagonismo bacteriano y, actúan inhibiendo el desarrollo de otras cepas de la misma especie, al unirse en forma específica a los receptores situados en la pared celular de las bacterias sensibles y, una colicina determinada da lugar a la selección de mutantes bacterianas resistentes que no son capaces de absorberse.

En general, este tipo de sustancias antagónicas, actualmente recibe el nombre de bacteriocinas y su formación se debe a la presencia en la célula del bacteriocinógeno correspondiente, su producción está regulada por episomas que actúan independientemente de los cromosomas bacterianos. Los mecanismos de acción de las colicinas son: bloqueo de la fosforilación oxidativa, deteniendo la totalidad de la síntesis macromolecular, degradación del ADN e inhibición de la síntesis proteica (25, 46).

1.6.3 Reversión de formas L bacterianas:

La reversión puede ocurrir en protoplastos, esferoplastos y formas L inestables. Landman y sus colaboradores obtuvieron reversiones cuantitativas de formas L en un medio conteniendo el 25% de gelatina a 26°C (45).

Para iniciar la reversión de las formas L se siembra en medios progresivos L en los cuales se va bajando la concentración de sacarosa, suero de caballo, levadura y antibióticos (en los medios que los llevan), de tal manera que se tengan medios cada vez más cercanos a los medios clásicos.

Una vez que se ha obtenido desarrollo en un medio desprovisto de las sustancias antes mencionadas, se resiembra el cultivo a medios comunes de BHI y gelosa sangre y se resiembra en éstos hasta obtener la total reversión de la bacteria y poderla identificar por medios serológicos y bioquímicos (17, 19, 45).

1.7 Condiciones de cultivo:

La propiedad principal de microorganismos con pared celular defectuosa, además de la variación morfológica, es su sensibilidad a la presión osmótica (35). Normalmente las bacterias mantienen una osmolaridad interna marcadamente alta en relación a la osmolaridad ambiental.

La carencia de la función protectora de la pared celular en la fase L, requiere una compensación osmótica en el medio igual a un valor osmótico del citoplasma bacteriano, con el objeto de proteger del estallamiento a la frágil membrana celular. El citoplasma de algunas especies bacterianas tiene un valor osmótico igual al suero sanguíneo, pero en otras, éste es aproximadamente tres veces más alto. La resistencia de la tensión y -

expansividad de la membrana limitante son también factores importantes por lo que la naturaleza del estabilizador osmótico es de gran importancia.

Inmediatamente después de la inducción, la fase L crece mucho más lentamente que la fase bacteriana, pero debido a su pronta adaptación en repetidas transferencias, pueden alcanzar su tamaño máximo tan rápido como lo hacen las colonias bacterianas (23).

El primoaislamiento se lleva a cabo en un medio sólido conteniendo una baja concentración de agar, suero inactivado y un estabilizador osmótico que normalmente es sacarosa o cloruro de sodio. Una vez que se estabilizan los microorganismos, la composición del medio es menos crítica y frecuentemente las formas L pueden adaptarse a crecer en un medio líquido. Como una regla general, las formas L son menos sensibles osmóticamente que el protoplasto de la misma especie; esto probablemente se debe al hecho de que sus membranas limitantes contienen significativamente una alta concentración de lípidos. Parece, por consiguiente, que las formas L son capaces de compensar la ausencia de la pared celular rígida por modificación de la composición de esta membrana (45).

El medio general base es un digerido triptico o caldo infusión de corazón de buey conteniendo una concentración final de 1.3 a 1.5% de agar, 10% de suero de caballo inmunizado y -

una sustancia osmóticamente activa como es sacarosa de 10 a 20% o cloruro de sodio al 3%; otras sales que pueden emplearse son: cloruro de amonio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio y fosfato ácido de sodio. Algunos medios comerciales, satisfactorios para el aislamiento de formas L, son el Agar PPIO, base agar sangre, agar tripticaseína soya, agar infusión cerebrocorazón, base agar sangre triptosa, caldo Todd Hewitt con adición de agar y agar Brucella Albimil. En algunos medios se ha adicionado extracto de levadura, ADN y algunos antibióticos como penicilina y anfotericina.

El pH óptimo para el desarrollo de las formas L es alrededor de 7.5 y la temperatura de incubación de 37°C, llevándose a cabo en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis.

El tiempo de incubación máximo será de 30 días, después de los cuales si no hay desarrollo, se considerará negativo.

Para propósitos de subcultivos, es muy eficiente el medio líquido, puesto que es posible revelar incluso un inóculo pequeño y por lo tanto es peligroso cuando existe aún una ligera contaminación. Puede utilizarse en el primoaislamiento, siempre y cuando se use paralelamente un medio sólido como control, que deberá manipularse exactamente como el medio de cultivo líquido (23).

1.8 Falsos positivos:

El desarrollo de la fase L puede ser imitado no solo por bacterias de crecimiento pleomórfico, sino además por artefactos -- que no son viables. El conocimiento de la existencia de pseudocolonias y pseudoelementos es de gran importancia en cualquier intento de aislamiento de formas L.

Una de las condiciones favorables para el desarrollo de artefactos es un período largo de incubación del material biológico.

Se ha observado que el medio L rico en suero da origen a multitud de elementos circulares que provocan el ser observados e identificados como fase L, si no se toman en cuenta otras características distintivas de ésta.

Algunos autores reportan que la hipertonicidad del medio es un factor que favorece también la formación de dichos artefactos. Por el uso de colorantes y sueros antiespecie fluorescentes, es posible encontrar en tejidos normales y en tejidos celulares las mismas estructuras, así como detectarlas en soluciones de colesterol y tinciones de ADN.

Se han observado estructuras semejantes por aplicación de colorantes fluorescentes para las células blancas y rojas de la sangre.

La tinción negativa de preparaciones de cultivos celulares para microscopía electrónica, puede dar origen a la formación de dichos elementos.

Además de la morfología, la transferibilidad es un criterio de gran importancia para la diferenciación entre artefactos y formas L. En la transferencia directa de colonias de medio sólido a medio sólido sin incubación intermedia, o suspensión en líquidos que contengan material biológico, se apreciará menor cantidad de estos elementos los cuales resultan de la incubación.

Se puede prevenir la formación de artefactos causados por el medio enriquecido con suero de caballo, o al sustituir éste por una solución de gama globulina de suero de caballo.

Un método rápido y fácil para demostrar que los artefactos no son viables, es la incorporación de tetraciclina o kanamicina en el medio (23).

1.9 Identificación:

El método principal para la identificación de una forma L, se basa en la característica de mayor importancia de las mismas, que es la capacidad de multiplicarse y revertir a la forma bacteriana que le dió origen, tomando en cuenta que ni Mycoplasma ni los artefactos pueden hacerlo. Ahora bien, una vez que se ha logrado la reversión a la forma bacteriana normal, se llevarán a cabo las técnicas de identificación clásicas de rutina y específicas para cada especie y género.

Al realizar dicha reversión, es de suma importancia tomar en-

cuenta la posible contaminación bacteriana, principalmente si se emplea un medio líquido, ya que podría darse el caso de considerar este desarrollo como la reversión de la forma L a su forma original.

Los aislamientos no revertidos pueden identificarse mediante otras técnicas como la clasificación inmunológica, o utilizando la prueba más específica que es la inhibición del crecimiento, lo que da como resultado la diferenciación entre una especie de Mycoplasma y una forma L.

En la prueba de inhibición del crecimiento se inocula el microorganismo de prueba en un medio sólido, en el cual se colocan discos de papel impregnados con el suero antiespecie correspondiente. Para ello, se precisan concentraciones relativamente elevadas de anticuerpos, pero la prueba es sencilla y permite identificar en forma inequívoca a las especies. Los sueros antiespecie utilizados son de diferentes especies de Mycoplasma, ya que hasta el momento no se cuenta con sueros específicos comerciales de las formas L. Sin embargo, en este tipo de identificación deberá tomarse en cuenta el hecho de que algunas especies de Mycoplasma poseen antígenos comunes con algunas clases de formas L.

Otra forma de identificación de la forma L es por medio del estudio del ADN tomando como base que hasta el momento no se han encontrado similitudes entre el ácido nucleico de un My-

coplasma y de una bacteria o de su forma L.

La electroforesis en gel de los constituyentes de la forma L es muy específica, pero se requiere un excelente desarrollo en medio líquido que posea la cantidad suficiente de proteínas y además es necesario disponer de un catálogo de muestras o patrones de comparación. Una ventaja de este método es la posibilidad de incluir a Mycoplasma en la diferenciación (23, 25).

1.10 Reproducción:

La ausencia de pared celular rígida, se asocia a un tipo de replicación muy diferente al de las bacterias típicas, en el que la división se inicia con el crecimiento de la membrana plasmática hacia el interior, crecimiento que frecuentemente se produce en relación a un mesosoma. Este crecimiento de la membrana acaba formando un septo completo que divide a la célula transversalmente y cuyo grosor es superior al de la pared celular periférica. La división de este septo a partir de la periferia de la célula, da lugar a la separación de las células hijas.

La pérdida parcial o total de la pared celular trae como consecuencia la alteración de la función de los mesosomas y por lo tanto no hay formación del septo.

Las formas L pueden dividirse lentamente, en especial en las profundidades de una placa de agar, cuyas fibras pueden ayudar

a la separación de las células hijas; pero al faltar el septo, el tamaño de las células hijas varía extraordinariamente.

El papel que juega la tríada de Dienes, corpúsculos elementales, gránulos y cuerpos largos en orden ascendente de tamaño en la reproducción de las variantes en fase L, es indeciso. Una razón es que las estructuras están en transición y la forma y número están determinados ambientalmente.

Los elementos pequeños aparecen dentro de los cuerpos largos, éstos varían en tamaño, de 0.05 micras para los corpúsculos elementales; 0.1 - 1 nm para los gránulos y de 1 - 50 nm para los cuerpos largos. Corpúsculos y gránulos pueden además crecer fuera de la superficie de los cuerpos largos y aparecen como cadenas cortas y filamentos.

Los métodos de reproducción de las formas L todavía no se han establecido; se han sugerido dos hipótesis:

- a) La primera indica un ciclo reproductivo en que las pequeñas unidades se multiplican dentro de un cuerpo largo y esto provoca estallamiento con la liberación de muchos cuerpos pequeños que después comienzan otro ciclo de reproducción.
- b) La otra considera que ocurre una reproducción por fisión de los cuerpos largos; en ausencia también de una pared celular rígida, frecuentemente se produce una división ineficaz, de modo que muchos elementos de varios tamaños y compleji--

dad, de los cuales no todos son viables, son lanzados al medio de cultivo (23, 25, 35, 45).

Los corpúsculos elementales embebidos en el agar, aumentan de tamaño, se dividen y aparece el crecimiento en el interior del agar, después en la periferia hasta formar la típica colonia, observándose que la capacidad de multiplicarse y la variedad morfológica están en relación con el medio de cultivo utilizado (17).

1.11 Genética:

El génoma de la bacteria permanece invariable en el paso a forma L, por lo que ésta retiene todas las propiedades fisiológicas de la forma original, exceptuando las asociadas a la pared celular, por lo que al revertir dan bacterias con la morfología igual a las bacterias originales (28, 90, 93, 108).

Los cambios hereditarios producidos por los agentes inductores ya mencionados, son independientes del ADN y se considera como un cambio fenotípico dirigido y adaptativo de los procesos hereditarios.

Algunos agentes inductores no se limitan a seleccionar a los mutantes espontáneos, sino que, al parecer, impiden que las células retengan un compuesto esencial que forma parte de la pared, y cuya ausencia da lugar a que la síntesis de dicha pared resulte imposible (25).

Las formas L son probablemente protoplastos o esferoplastos de especies bacterianas, las cuales han perdido su capacidad de formar una pared celular típica, su origen puede deberse a un factor del medio ambiente y no tienen la capacidad genética para dirigir la síntesis de enzimas específicas para la pared celular. Una alternativa es la de creer que se requiere el material de la pared celular como un cebador para su propia síntesis. Así, si un factor ambiental destruye la pared celular más allá del umbral requerido como cebador para síntesis, la bacteria sobreviviente es capaz de crecer y reproducirse a voluntad, permaneciendo ausente su pared celular.

La pérdida genética de la capacidad de sintetizar la pared celular puede reflejarse en el resultado de que algunas formas L contienen menos ADN y otras, menos genes que su bacteria original (69).

1.12 Capacidad patógena de las formas L

Los estudios iniciales sobre formas L tenían el propósito de probar que tienen importancia patogénica y no solo un instrumento biológico útil para investigaciones concernientes al estudio de pared celular o una hipótesis de los ciclos de vida en las bacterias.

Las formas L son de un gran interés en la cronicidad de procesos patológicos ya que se han considerado como posibles agen--

tes etiológicos.

Los componentes en el complejo de la pared celular que se considera son responsables de la virulencia de las bacterias, se dividen en tres grupos: a) Los responsables de la resistencia a la defensa celular; b) Los responsables de la resistencia a la defensa humoral y c) Los que son tóxicos a los tejidos del huésped ya sea directamente o por mecanismos inmunológicos.

Debido a que algunos o todos los componentes protectores superficiales antifagocíticos se pierden en la generación de formas L, se podría esperar que éstas sean más sensibles al suero que las bacterias originales; sin embargo, puesto que el suero inmune puede generar formas L en algunos microorganismos, no es una regla general que todas las formas L sean más sensibles que las bacterias originales a la reacción bactericida inmune u otros factores antimicrobianos humorales.

La presencia de lisozima en la mayor parte de los fluidos del organismo, probablemente daría por resultado la degradación del peptidoglucano. La persistencia de formas L depende entonces de la satisfacción local de sus requerimientos osmóticos y de la susceptibilidad de las cubiertas a la lisis por componentes del suero u otros fluidos del organismo. La multiplicación de formas L efectivas podría depender de muchos factores, incluyendo el de proveer de sus requerimientos

de desarrollo exclusivos, de la necesidad de substancia intracelular de soporte para su división y de su capacidad para ser protegidas de la fagocitosis.

Hay una amplia evidencia de que in vivo e in vitro, algunas formas L continúen con la síntesis, secretando algunos compuestos en el medio ambiente y dejando de sintetizar otros. Algunos compuestos que normalmente no son excretados por las bacterias originales son expulsados por formas L (35).

El compuesto tóxico más conocido de la compleja pared celular bacteriana, es la endotoxina de los microorganismos Gram negativos. El aspecto tóxico de esta molécula de lipopolisacárido parece ser la mitad lipídica y produce una gran variedad de reacciones tóxicas similares a cualquier otro producto natural conocido.

Muchas formas L de Gram negativas son tóxicas en una gran variedad de sistemas analizados, ya que el material residual de la pared celular está frecuentemente presente en la cubierta de las mismas, causando lesiones dermonecroticas. Estas lesiones se considera que se deben a la mitad del peptidoglucano del complejo pared celular.

Otra evidencia es que la exotoxina de Clostridium tetani, es secretada también por formas L estabilizadas, la cual semeja en orden de toxicidad a la toxina original; existiendo el peligro potencial de tratar heridas propensas a tétanos solo con peni-

cilina en las personas no inmunizadas.

Existen dos posibilidades acerca de la patogenicidad de las formas L;

- 1) Que no sean patógenos primarios, sino formas sobrevivientes responsables de subsecuentes recaídas de la enfermedad.
- 2) Que se requieran condiciones muy específicas para producir su patogenicidad.

Un importante estudio de Mc. Kay sugiere que esta última posibilidad es la correcta (84).

Si suponemos por el momento que las formas L son susceptibles a la fagocitosis, éstas podrían permanecer en condiciones ambientales que les permitan quedar protegidas de los fagocitos o en las que la función fagocítica sea pobre. Debido a que se requiere la presencia de superficies para una fagocitosis efectiva, en sangre, fluido ascítico, o en abscesos de cavidades, los microorganismos susceptibles a la fagocitosis pueden pasar inadvertidos. En el medio ambiente hipertónico de la médula renal la función fagocítica es muy pobre. En la red de fibrina de un trombo la movilidad de los fagocitos probablemente se impida en gran medida y las formas L son capaces de sobrevivir. El sitio intracelular es otro refugio potencial de la fagocitosis para las formas L.

Además, muchas bacterias secretan moléculas pequeñas que son quimiotácticas para los leucocitos polimorfonucleares. Todas

Las bacterias son generalmente estimuladores potentes para la migración de leucocitos, sin embargo, algunas formas L pueden no serlo, puesto que no secretan los mismos compuestos y pueden carecer de antígenos superficiales u otros componentes -- que median la respuesta inflamatoria (10, 102, 107).

Las formas L bacterianas pueden, después de obtener un nicho protector, ser capaces de causar enfermedad por producción de toxinas o inmunógenos que resultan del tejido dañado o poder causar directamente citotoxicidad.

Se ha encontrado mayor facilidad para la transformación a formas L de bacterias poco virulentas, que ante cepas bacterianas altamente virulentas (9, 17, 23, 25, 35, 49, 58, 106).

Desde el punto de vista de su presencia en el organismo humano, de su capacidad para producir procesos patológicos y de su presentación, se dividirán de acuerdo a los sitios de donde se les ha aislado y/o en relación al microorganismo al que corresponde.

a) Procesos abscedales y ostiomielíticos. La primera forma aislada de un ser humano por Dienes y Smith fué a partir de una secreción purulenta acumulada en la cavidad peritoneal, secundaria a una infección localizada en las trompas de Falopio, y que al aislarla y revertirla se identificó como Bacteroides sp. Godzeski y Cols (48) aislaron formas L en once pacientes con infecciones crónicas vesicula-

res por estafilococo. La bacteria original presentaba resistencia a los antibióticos usuales, las formas L obtenidas revirtieron a las formas originales en medios de cultivo adecuados.

Charache y Cols., (20) en forma semejante, aislaron formas L de material purulento que al ser subcultivadas en medios adecuados revirtieron a la forma original

b) Infecciones estreptocócicas. Desde las descripciones originales sobre la posibilidad de obtener formas L, a partir de Streptococcus haemolyticus en forma experimental (100, 101), se había insistido sobre la posibilidad de aislarlas de casos estreptocócicos y, en particular, de procesos crónicos como la fiebre reumática con o sin carditis.

En los últimos años han aparecido artículos que confirman estas hipótesis. Kaplan (65) encontró reacción cruzada entre estreptococos del grupo A y el tejido cardíaco de enfermos con endocarditis bacteriana aislando formas L de Streptococcus.

Godzeski (44) en músculo cardíaco tomado de un proceso quirúrgico en un individuo con historia de enfermedad reumática, aisló igualmente formas L de Streptococcus.

El estudio más impresionante sobre fiebre reumática lo realizó G.Y. Kagan (48) en Moscú, quien en 20 pacientes con fiebre reumática activa, aisló en 13, formas L y en 4 for-

mas transicionales; los subcultivos demostraron que pertenecían al genero Streptococcus. El mismo autor, en 14 pacientes con endocarditis séptica, aisló 6 formas L y una transicional que revirtieron a Streptococcus. El aislamiento se efectuó en sangre periférica, con el antecedente de que algunos pacientes habían sido previamente tratados con antibióticos en forma masiva.

Mortimer (88) ha aislado formas L de Streptococcus haemolyticus en procesos sistémicos, concluyendo que estas formas pierden su proteína M y el carbohidrato específico al revertir.

c) Padecimientos neurológicos. Kagan y Cols (48) en 144 pacientes con meningitis, que incluían 8 casos con absceso cerebral, aislaron formas bacterianas en el 14%, cultivos mixtos con bacterias y formas L en el 3.4%, formas L inestables en el 2.8% y formas L estables en el 15% de los casos. Entre las bacterias que se obtuvieron al revertir, se encontraron en orden de frecuencia: Staphylococcus, diplococo lanceolado y cocobacilos semejantes a Haemophylus. La mayoría de los pacientes habían recibido terapia con antibióticos. En algunos casos se aislaron reiteradamente formas L en pacientes que presentaban una evolución crónica del padecimiento, cuyos tiempos variaban entre 30 y 63 días a pesar de recibir antibióticos a dosis elevadas durante un tiempo

prolongado.

- d) Infecciones urinarias. Las bacterias en la orina encuentran presiones osmóticas que exceden en mucho a las necesarias para la protección de las formas L y protoplastos, alcanzando presiones del orden de 1,200 a 1,300 mOsm/L, (13, 48) se antoja lógico pensar que en este medio pueden permanecer viables más que en cualquier otro líquido del organismo, además hay que considerar que la orina infectada contiene lisozima, anticuerpos, antibióticos, glicina, bacteriófagos y otros agentes que pueden debilitar la pared celular -- hasta llevar a la lisis a las células bacterianas. Braude (48) ha encontrado en animales de experimentación, que las formas L están preservadas en el interior de células fagocíticas de la vejiga e, inclusive, parecen multiplicarse dentro de ellas. Así, este investigador explica las recaídas y anota en sus experimentos que la ingestión de líquidos en abundancia disminuye la osmolaridad y la recaída (13).
- Guze y Kalamanson (49) demostraron formas L en riñones de ratas con infección hematógena que produjo pielonefritis -- por enterococo. Tratando a las ratas previamente con penicilina, la bacteria fué erradicada por el antibiótico, lo cual se demostró por cultivos en medios ordinarios. Al cultivar en medios especiales se logró obtener formas L y posteriormente revertirlas a su forma original. En otro estu-

cio, estos mismos autores (48) aislaron formas L de riñones humanos de 25 pacientes seleccionados para cirugía, tomándolos en el mismo tiempo del acto quirúrgico, la biopsia renal de cada uno. En los resultados se observó que en 5/7, es decir, en el 71% de los pacientes con formas L, había evidencia histológica de pielonefritis. En los pacientes tomados como controles que no tenían evidencia clínica de pielonefritis y en quienes no se aislaron bacterias ni formas L, 2/13 (15%) presentaron evidencia histológica de pielonefritis. De manera que en 7/25 pacientes que tenían pielonefritis a la biopsia renal, solamente en 5 se aislaron formas L (56%), mientras que en el 12% sin evidencias de pielonefritis se encontraron formas L.

Gutman y cols. (47) examinaron 146 muestras de 57 pacientes con bacteriuria crónica, 73 muestras de 59 pacientes con padecimiento renal no infeccioso y 15 muestras de 15 admisiones consecutivas por enfermedad sin compromiso renal. Se demostró la presencia de formas L en el 11/57 (19%) que tenían bacteriuria crónica y en ninguno de los pacientes de los dos grupos testigo. En un caso en el que se aislaron formas L que revirtieron a E. coli, la misma bacteria se aisló de un cultivo de biopsia renal. Recientemente este mismo autor (48) reportó la utilidad de la erradicación bacteriana con el uso de ampicilina y eritromicina en un niño con lupus eri

Leptotomus en quien se aislaba en forma reiterada formas L que revertían a Proteus mirabilis.

Clark y cols. (48) demostraron formas L en 11/57 pacientes con infección urinaria crónica. A estos pacientes se les aislaron formas L durante el tratamiento y al revertirlas se identificaron las bacterias originales. Lo importante de este estudio es que el autor demuestra que en la exacerbación se aisló de los pacientes el mismo microorganismo, sugiriendo que las formas L sean una causa importante de recaídas en la infección crónica.

- d) Cada vez con mayor frecuencia se presenta el caso de pacientes, que a pesar de estar recibiendo una terapia apropiada e inclusive masiva, de antibióticos de diferentes espectros, el cuadro clínico no se modifica en forma importante, presentándose elevaciones térmicas de consideración. En estos pacientes el enfoque ha sido buscar el posible mecanismo que perpetúa el proceso infeccioso (61).

Mattman (48,78) ha cultivado formas L de pacientes con procesos septicémicos. Estos pacientes no respondieron al tratamiento con antibióticos, presentando hemocultivos reiteradamente negativos en los medios ordinarios. El cultivo de sangre y de líquido cefalorraquídeo en medios especiales evidenció la aparición de formas L que en pases sucesivos rewertieron a su forma original. Godzeski (48) en 11 pa--

cientes con infección estafilococcica crónica aisló en sangre cultivada en forma especial formas L, mientras que no logró crecimiento en los medios rutinarios. Estas formas revirtieron a Staphylococcus al pasarse a medios ordinarios de cultivo.

En un trabajo reciente, Mattman (48) reporta el aislamiento de formas L en 328 muestras de 164 pacientes a quienes se les practicó hemocultivo por causas diferentes. El aislamiento general fue de 39%; en el 11% fueron bacterias en su forma vegetativa y en 38% fueron formas L, que al revertirse se encontró, en orden de frecuencia Staphylococcus, -- Streptococcus haemolyticus y Streptococcus pneumoniae.

En casos bien estudiados de tuberculosis pulmonar Mattman (48) encontró que el 35% tenía formas L, las que se determinaron por anticuerpos fluorescentes, 7 de los casos positivos mostraron formas L que revirtieron a Mycobacterium tuberculosis (78)

En un paciente con fiebre crónica de origen desconocido, 6 muestras para hemocultivo sembradas en medios especiales desarrollaron formas L, todas las muestras revirtieron al bacilo tuberculoso. La bacteria original no se aisló en vida del paciente y la autopsia reveló tuberculosis avanzada.

Es importante hacer notar que también se han aislado formas atípicas o protoplastos de hongos levaduriformes, como el caso publicado por Rosener (97) de Candida tropicalis en un paciente con endocarditis que evolucionó fatalmente. En este caso, previo al tratamiento con anfotericina B, se aisló la forma normal de Candida tropicalis en hemocultivos repetidos. Después de administrar anfotericina B a dosis elevadas durante 11 días, se encontraron formas atípicas del microorganismo, las que crecían sólo en medios osmóticamente adecuados y posteriormente revirtieron a su forma original. En los cortes de válvula mitral se pudieron identificar las células levaduriformes. El autor piensa que en este caso la anfotericina fue el factor inductor de las formas atípicas (97).

Otros padecimientos en los que se han encontrado formas I, son: Salmonelosis, brucelosis, fibrosis quística y meningitis (23).

CAPITULO II

ENFERMEDADES DEL TRACTO URINARIO

2.1 Anatomía y Fisiología del Sistema Urinario.

Está constituido por riñones, vejiga urinaria, uretra y ureteros. Su función principal es la formación y eliminación de orina; solución acuosa de productos de desecho metabólico y de otros compuestos que son potencialmente tóxicos para el mantenimiento de la homeostasis. Satisface esta función por llevar a cabo los siguientes procesos: a) filtrar los desechos metabólicos, eliminándolos del organismo; b) ayudar a regular el equilibrio hídrico y, c) ayudar a regular el equilibrio ácido base de la sangre.

Como parte de su función, la orina secretada continuamente por los riñones, es conducida por los ureteros a la vejiga urinaria, donde se almacena hasta el momento de su evacuación a través de la uretra (11).

Riñones:

Son dos órganos en forma de habas que se encuentran detrás del peritoneo parietal, contra la pared abdominal posterior y exactamente arriba de la cintura. El hígado empuja al riñón derecho hacia abajo, de modo que queda en un nivel inferior -

respecto al riñón izquierdo. En la parte superior de cada uno de ellos se encuentra una glándula suprarrenal, la cual es un órgano endocrino y no parte del sistema urinario.

Cada riñón tiene una superficie anterior, una posterior y un borde lateral convexo o externo. La superficie medial de cada riñón tiene una superficie concava o depresión llamada hilio, arteria renal, venas, vasos linfáticos y nervios entran y salen del riñón a través de esta depresión. En el hilio se encuentra una cavidad en forma de saco llamada pelvis renal. Esta es la porción colectora del riñón y representa la porción amplia del uretero. Cada riñón está dentro de una cápsula fibrosa resistente.

En un corte transversal de riñón se observan dos áreas distintas: una área oscura interna, la médula y un área externa más clara, la corteza. La primera está dividida en varias cuñas triangulares llamadas pirámides renales, las bases de éstas bordean la corteza y sus ápices convergen hacia el centro del riñón. Estos ápices se llaman papilas renales y empujan en cavidades de la pelvis llamadas cálices. El examen microscópico de un corte de tejido renal revela numerosas estructuras en forma de embudo con largos tallos contorneados, se llaman nefronas o unidades funcionales del riñón. Cada riñón contiene aproximadamente un millón de nefronas y cada una de ellas consta de: a) un corpúsculo renal compuesto por el glo

mérulo y la cápsula de Bowman y b) un sistema tubular (103).

La arteria renal entra al riñón por el hilio junto con los nervios y vasos linfáticos del riñón. Inmediatamente después de entrar al riñón, la arteria renal se divide en numerosas ramas que se extienden hacia la corteza. Estas ramas se llaman arteriolas aferentes y cada una de ellas termina en unas cincuenta asas capilares llamadas glomérulos o retículos capilares. Esta estructura capilar y la cápsula invaginada en la que ésta se encuentra, constituyen el corpúsculo renal. Un vaso que sale, llamado arteriola eferente, recoge sangre del corpúsculo renal. Después de un breve recorrido, la arteriola eferente se divide en una fina red de capilares que rodea a los túbulos. Los capilares se unen mediante vasos intermedios para formar la vena renal, la cual sale del riñón por el hilio.

Los riñones regulan de tres formas el equilibrio ácido base: -

- a) Secresión de iones hidrógeno; b) formación de amoníaco y
- c) excreción de iones bicarbonato (11).

La secreción de iones hidrógeno se realiza principalmente en los túbulos distales, donde los iones secretados reaccionan con el fosfato disódico (encontrado en el filtrado glomerular) para formar fosfato monosódico y sodio, éste es luego reabsorbido hacia la sangre a través de la membrana tubular. En esencia, la secreción de iones hidrógeno por las células del túbulo distal a cambio de los iones sodio, hace más alcalina la --

sangre al hacer más ácida la orina.

Un segundo mecanismo para mantener el equilibrio ácido-base, -- es la formación de amoníaco. En este mecanismo, las células -- tubulares distales, sintetizan amoníaco, el cual se combina -- con iones hidrógeno para formar un ion amonio, por lo tanto, -- el efecto final de la secreción de amonio sobre el control del pH es el mismo que el de la secreción del ión hidrógeno. Los iones básicos sustituidos en el proceso difunden luego a las -- células tubulares, donde se combinan con un ión bicarbonato, -- formando una base bicarbonato que se reabsorbe en la sangre y que determina en gran medida el pH de la misma.

Las células de la porción distal del túbulo secretan iones hidrógeno y ciertos subproductos nitrogenados del metabolismo -- así como fármacos, pigmentos, toxinas, ácido úrico, aminoácidos, hormonas y sales.

Casi la mitad de solutos contenidos en la orina evacuada -- consiste en urea, principal producto de desecho presente en la -- orina, el resto consiste en creatinina, cloruro de sodio y diversas sustancias orgánicas e inorgánicas (11, 50, 103, 109).

2.2 Infecciones Urinarias

Las infecciones urinarias pertenecen al grupo de los procesos infecciosos más frecuentes de la patología médica. Su importancia radica en el daño que pueden ocasionar sobre la fun- -

ción renal, pueden involucrar sólo un sitio como la uretra -- (uretritis), próstata (prostatitis), vejiga (cistitis), ureteres (ureteritis), riñones (pielonefritis); aunque frecuentemente afectan más de una región de este sistema, como es el caso de la uretra y vejiga (uretrrocistitis); ureteres, pelvis y parénquima renal (ureteropielonefritis).

La pielonefritis y las infecciones acompañantes del tracto urinario son causas frecuentes de insuficiencia renal y producen una considerable morbilidad (sobre todo en adolescentes); son una complicación frecuente del embarazo y cuando se asocian a lesiones estructurales o neurológicas del tracto urinario, a cualquier edad, originan a menudo incapacidad severa y muerte. La sepsis bacteriana por bacilos Gram negativos asociados a los problemas derivados de la colocación prolongada de un catéter urinario, alcanzó enormes proporciones en hospitales y entre enfermos crónicos (56).

2.3 Factores defensivos del organismo:

Los microorganismos que se encuentran por lo común en la uretra o que se introducen en la vejiga, tienden a ser removidos por el proceso de micción y son en apariencia inhibidos por los mecanismos antibacterianos presentes en la mucosa de la vejiga (macrófagos activos que sintetizan inmunoglobulina A) -- y los sistemas de defensa del organismo tales como pH, osmola-

dilución. Sin embargo, con la diuresis forzada, disminuye también la concentración de las sustancias protectoras presentes en la orina. Uno de los factores que actúa como adyuvante en las mujeres embarazadas para la proliferación bacteriana, es que el pH se encuentra más a menudo entre los límites favorables para la reproducción de los microorganismos. La osmolaridad urinaria en el hombre suele ser inferior a 800 mOsm/kg, y actúa como mecanismo secundario de protección. La hidrodinámica urinaria parece ser el mecanismo protector más importante del hombre. La eliminación de bacterias, por una combinación de flujo urinario y de micción periódica, es un poderoso pero incompleto mecanismo de limpieza bacteriana de la vejiga. La mucosa vesical intacta elimina las bacterias que quedan en la fina película de orina que permanece sobre ella, incluso luego de una micción completa. Se postuló que los ácidos orgánicos producidos por las células mucosas, son los responsables de la muerte de las bacterias de la orina residual y no los anticuerpos locales o los fagocitos. Estos mecanismos pueden superarse cuando la vejiga se vacía de manera incompleta y esto hace pensar en el papel que desempeñaría el volumen residual como determinante valioso de la sensibilidad a la infección.

2.4 Factores predisponentes:

La retención urinaria por los mecanismos de obstrucción funcio

nal o patológica ofrece a los microorganismos una oportunidad de multiplicarse dentro de la vejiga, pudiendo luego ascender por vía ureteral, tal vez facilitada por el reflujo vesicoureteral o a través de los linfáticos de la pelvis renal y cálices, y de esta manera alcanzar uno o ambos riñones. Las observaciones clínicas, epidemiológicas y las experimentaciones en animales permitieron determinar varios factores de gran importancia en la patogénesis de las enfermedades urinarias. La pielonefritis aguda comienza en el área medular y se disemina dentro de la corteza renal dando como resultado de la formación de numerosos microabscesos. Aunque los glomérulos no están a menudo involucrados, el nefrón disminuye sus funciones por la lesión destructiva. La lesión inflamatoria tiende a ser confinada en un segmento al principio pero luego se expande. Es de considerable interés apreciar porqué la médula renal es más susceptible a la infección que la corteza. A veces se producen excepciones con microorganismos en particular virulentos como, por ejemplo, en sepsis o pielonefritis aguda por Staphylococcus. La sensibilidad casi siempre superior de la médula renal a la enfermedad por microorganismos menos virulentos, parece explicarse por el limitado flujo sanguíneo en esta región, el retraso en la movilización de leucocitos (disminución de la actividad macrofágica) y el ambiente local de elevada tonicidad y pH bajo para la fagocitosis. La acción pro

lectora de la diuresis acuosa sobre el mecanismo de defensa mgdular renal, se atribuyó a la capacidad de la médula para contrarrestar estos efectos. Los datos experimentales indican -- que la producción de iones amonio inhibe el cuarto componente del complemento y por este mecanismo interfiere la actividad - bactericida (14).

2.5 Factores importantes en la patogénesis de las enfermeda- des Urinarias:

2.5.1 Edad y sexo:

Recién nacidos y niños en edad preescolar: Las enfermedades - urinarias son muy comunes en la infancia, pero la frecuencia exacta de bacteriuria en lactantes se desconoce; ésta en las infecciones verdaderas, debe ser inferior a la referida en es- tudios en los que se utilizan las bolsitas plásticas para la recolección de la muestra, sin confirmación ulterior. El fac- tor predisponente básico, es la materia fecal de los pañales que contamina el meato uretral en los bebés.

En niños de edad preescolar la frecuencia de infección descri- ta en la literatura, varía en forma amplia por la diferencia - de los métodos de recolección y la diversidad de criterios so- bre lo que es bacteriuria y lo que no lo es. Son alrededor de 10 a 20 veces más frecuentes en las niñas que en los niños (56).

Edad escolar: Un trabajo reciente de Kunin sobre 8,206 niños, revela que la frecuencia de bacteriuria en las niñas (1,2%) es elevada en comparación con la observada en los niños (0,04%) - lo que supone una relación de 30:1.

Estos datos confirman la notable sensibilidad de las mujeres a las enfermedades urinarias donde los factores predisponentes - como son la excesiva frecuencia de obstrucciones vesicales, reflujo vesicouretral y uretra más corta, resultan determinantes.

Mujeres adultas: El índice de la bacteriuria en la mujer aumenta con la edad y la actividad sexual. La frecuencia de bacteriuria en las monjas jóvenes es de sólo 0.5% y no alcanza el 1% entre los 35 años y 44 años de edad. En la mujer, la frecuencia de infecciones urinarias aumenta con la edad y puede - llegar a un 10% en ancianas. Con el comienzo de la actividad sexual suele ocurrir el síndrome conocido por los médicos como "cistitis de la luna de miel". La infección se convierte en - una complicación importante en el embarazo, sobre todo en el - primer trimestre y se manifiesta con frecuencia en forma de - - pielonefritis aguda (6, 56).

2.5.2 Embarazo:

En el primer trimestre oscilan entre un 2 y 6%. En nuestro - país, Casellas y col encontraron un 4% en un estudio realizado con embarazadas. La elevada tasa de infecciones urinarias durante el embarazo se considera hoy día como la consecuencia de

una bacteriuria adquirida en un momento anterior de la vida de la paciente. Al parecer existen alteraciones en el tracto urinario en el embarazo (pérdida fisiológica del tono ureteral, tamaño del útero, etc) que permiten el establecimiento de la colonización bacteriana en la orina, para invadir después al riñón. El peligro de prematuridad es superior de modo significativo en las mujeres con bacteriurias no tratadas existiendo un alto riesgo en este tipo de pacientes.

2.5.3 Bacteriuria en el varón:

Es poco frecuente hasta cerca de los 40-50 años, si no ha existido antes instrumentación del tracto urinario. Después de esa edad la hipertrofia de la próstata, las posibles obstrucciones u otras enfermedades que requieren manipulación de las vías urinarias son causa importante de infecciones urinarias (6, 56).

2.5.4 Obstrucciones:

La infección ocurre con facilidad si se produce una obstrucción parcial o completa de los uréteres. El importante papel que desempeña la obstrucción en la enfermedad se confirma por la gran frecuencia, de 15 a un 20% de pielonefritis clínicas, observadas en pacientes con lesiones obstructivas. En los hombres, una pielonefritis aguda sugiere con seguridad la probable lesión obstructiva una anomalía congénita, acodaduras, di

vertículos, etc en el grupo joven y cálculos y tumores prostáticos en el adulto (3, 14, 58).

2.5.5 Reflujo vesicoureteral:

El reflujo vesicoureteral puede demostrarse por radiología durante la micción en pacientes con episodios recurrentes de pielonefritis aguda. El reflujo de la orina vesical hacia los uréteres puede considerarse como un mecanismo por el que los microorganismos ascienden al riñón en lugar de ser eliminados por el proceso de micción. El reflujo vesicoureteral puede resultar la causa de una infección urinaria continuada y suele observarse en las infecciones urinarias de la infancia.

Está bien demostrado que cuando el reflujo es grave (asociado con hidrouréter e hidronefrosis) puede retardar el crecimiento renal en niños pequeños y debe corregirse (56).

2.5.6 Instrumentación:

No obstante las precauciones de asepsia durante la colocación de un catéter, luego de 4 a 5 días puede observarse en el 1 a 2% de los casos, una bacteriuria persistente. Es importante distinguir, para evaluar los peligros de la cateterización entre la única (por un breve período) y la prolongada (por lo general con balón de retención). Las primeras se asocian a una frecuencia de infección muy inferior a diferencia de las prolon

gadas. El peligro de infección por cateterización varía de acuerdo a ciertos grupos que son más sensibles a la infección: las mujeres antes del parto o en el puerperio, los ancianos y debilitados, los diabéticos y los pacientes que retienen un volumen de orina importante en la vejiga.

Cuando se usa un catéter permanente, la infección puede penetrar luego de la inserción, por burbujas de aire en el caso de drenaje abierto, o por una película de moco y pus entre el catéter y la pared uretral, cuando el catéter se mueve dentro de la uretra siguiendo los movimientos del paciente.

La cateterización urinaria prolongada, cuando los cuidados -- son pocos, puede constituir un peligro para los pacientes a quienes se debe proteger ya que es la causa principal de las infecciones urinarias iatrogénicas y el factor predisponente más asiduo para la sepsis mortal por bacilos Gram negativos (endotoxemia) (6, 14, 23, 56).

2.6 Vías de infección:

Hasta hace algunos años se consideraba que la vía descendente era la más frecuente (por ejemplo, luego de una angina). Se ha observado que los microorganismos Gram positivos son infrecuentes en las infecciones urinarias pero son los que causan las del tracto respiratorio en especial. En la actualidad se considera que la mayoría de las infecciones urinarias se

originan por la vía ascendente después de penetrar por el meate uretral, ésta es, con mucha diferencia sobre las demás, la vía más frecuente de infección en la mujer, sin embargo, se menciona a la instrumentación para ambos sexos. Ahora se acepta, de ordinario, que las bacterias ascienden por el tracto urinario por simple movimiento browniano y pueden llegar al riñón sin que exista una alteración del flujo urinario. La materia fecal, la flora bacteriana del introito uretral, las secreciones vaginales, etc, son los focos originarios. Además, existen datos experimentales de que las bacterias pueden llegar a los riñones por los vasos linfáticos constituyendo la llamada vía linfática.

La vía hematogena es menos frecuente que la ascendente pero a veces resulta muy importante. Cualquier infección bacteriana sistémica puede afectar al riñón, por ejemplo: una salmonelosis o una septicemia por Staphylococcus donde se encuentran abscesos corticales. Además, suele suceder el caso inverso, que por una pielonefritis se produzca una septicemia, como en el caso de los posoperatorios de las vías urinarias donde es posible observar el choque endotóxico producido por la liberación de las toxinas de los bacilos Gram negativos al torrente circulatorio.

En general, el tracto urinario se considera estéril, sobre todo riñón y uréteres, en vejiga y uretra suelen encontrarse mi

microorganismos que se consideran como flora normal de la piel, pero siempre en menor cantidad en la vejiga.

Como se mencionó anteriormente, la principal vía de infección renal es la ascendente, la cual es causada por microorganismos que provienen de la parte inferior del tracto, introduciéndose por el meato urinario que está expuesto a las evacuaciones vaginal y/o rectal, iniciándose la infección en la parte inferior del tracto urinario, ascendiendo luego a vejiga y ureteros, hasta llegar a los riñones.

Por la localización anatómica del meato urinario, la mujer está predispuesta en un grado mayor a una posible infección, debido a la cercanía de éste con la parte inferior del tracto gastrointestinal y el aparato reproductivo. En el hombre la probabilidad es menor debido a que no existe la misma localización anatómica y a la presencia de espermina que es una enzima bactericida.

Los microorganismos que infectan por esta vía proceden de:

- a) Flora habitual de la uretra anterior. La uretra anterior en el hombre y en la mujer, presenta de ordinario una flora autóctona constituida sobre todo por Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus, Micrococcus sp, Streptococcus del grupo D de Lancefield (enterococos), Streptococcus alfa y haemolyticus, Corynebacterium sp. (Difteroides), Bacteroides sp, y pocas veces Acinetobacter sp, Pseudomo--

nas sp y Mycoplasma sp.

b) Flora habitual de la zona prepucial. La zona prepucial, - de modo principal en los individuos no circuncidados, presenta una población bacteriana muy abundante, de la que -- pueden participar además de las bacterias propias de la -- uretra; enterobacterias, distintas especies de anaerobios (Veillonella sp, Fusobacterium sp) y Mycobacterium smegmatis.

c) Flora habitual de la región vulvovaginal. La zona vulvar y el introito vaginal también presentan de ordinario una - flora habitual, integrada por los microorganismos ya men-- cionados. En las niñas de corta edad suelen abundar en es- ta zona las especies de enterobacterias que se encuentran con más frecuencia en las infecciones urinarias. En las - mujeres en período de actividad estrogénica se encuentran las bacterias propias de la vagina (Lactobacillus sp). - Streptococcus del grupo D, Corynebacterium sp, Staphyloco- - ccus epidermidis, Bacteroides sp, Veillonella sp, Myco- - plasma sp, etc., son también un factor de contaminación - frecuente. Aunque no exista flujo vaginal manifiesto, se presenta por lo general una secreción mucosa que arrastra dichos microorganismos. En las mujeres en período posme- nopáusico y en las embarazadas, desaparece o disminuye la

concentración de Lactobacillus sp en la vagina, lo que permite el desarrollo preponderante de las restantes especies de la flora normal. Todos estos factores, facilitan la infección con bacterias de origen vaginal.

d) Contaminación fecal. La contaminación de la zona perineal con la flora fecal es inevitable en los lactantes. Por esta causa, en la entrada uretral abundan las bacterias que ocasionan con más frecuencia infecciones urinarias (Escherichia coli, Proteus mirabilis, el grupo Enterobacter-Klebsiella entre los Gram negativos, y enterococos entre los Gram positivos). A todos estos factores de contaminación provocados por causas que podríamos denominar naturales, deben sumarse los de origen infeccioso, o sea la uretritis, vulvovaginitis y colpitis (56, 59, 68, 109).

2.7 Clasificación de los padecimientos renales de acuerdo a la región afectada (24).

2.7.1 Pielonefritis:

Es la inflamación del parénquima renal y del sistema pielocaliceal. Se presenta como un síndrome infeccioso general agudo o atenuado, en el primer caso se presenta dolor en los flancos afectados, y/o a la palpación y fiebre asociada a una poliaquiuria o disuria. En la pielonefritis crónica se pre-

adultos se produce más frecuentemente una enfermedad renal -- crónica.

2.7.3 Pielitis:

Es una inflamación de la pelvis renal y los uréteres, que generalmente se presenta acompañada por una lesión de tejido -- renal (24, 56, 73).

CAPITULO III

ETIOLOGIA DE INFECCIONES RENALES

CAUSADAS POR FORMAS - L

El reciente interés en el aislamiento e identificación de formas L bacterianas es el resultado de reportes de su aislamiento de cultivos de orina y tejidos de riñón de pacientes con padecimientos renales. Se ha demostrado la persistencia de antígenos bacterianos en algunos tipos de pielonefritis en animales de laboratorio y en el hombre, existen reportes caracterizados por recaídas frecuentes a pesar de una aparente terapia adecuada; en muchos casos, la enfermedad presenta histológicamente un progreso a pesar de la ausencia de infección bacteriana, determinada por cultivos urinarios o examen biológico de biopsias renales. Esto se debe a que la bacteria persiste en el riñón aún después de una terapia antimicrobiana apropiada, en una fase en que no puede cultivarse en medios bacteriológicos estándar. Por estas razones la atención se dirigió a la fase L, la cual resiste la acción de antibióticos que afectan la pared celular, necesita protección osmótica y no puede cultivarse en los medios empleados de rutina en Bacteriología (3, 12, 13, 17, 18, 23, 46, 49, 63, 94, 99).

3.1 Agentes inductores de formas L en riñón:

Existen algunas condiciones y agentes que provocan que una --

bacteria sufra una modificación en la estructura de su pared celular, dando por resultado un microorganismo capaz de reproducirse y, bajo ciertas condiciones, revertir a su forma original causando recaídas sucesivas y tornándose en padecimiento crónico.

Las causas de inducción en una pielonefritis son las siguientes:

- a) En muchos casos tratados con antibióticos que afectan a la pared celular, como las cefalosporinas, cicloclerinas, y -- principalmente penicilinas, se han observado recaídas sucesivas en seguida de una aparente terapia adecuada, aislándose formas bacterianas atípicas de la orina de pacientes, durante el transcurso de la terapia y aún después de varias semanas de haber suspendido el tratamiento.

Las causas comunes de reincidencia incluyen: la elección de un antibiótico inadecuado, la irresponsabilidad del paciente al no tomar los antibióticos como es debido, la dosis insuficiente del mismo y el período limitado del tratamiento.

La presencia de formas mixtas en un proceso dinámico, en el cual algunas bacterias se transforman a su fase L ante la presencia del inductor adquiriendo una fase de resistencia, al dejar de actuar el inductor, revertirán a su forma original, si este fenómeno se prolonga, conducirá a la cro

nicidad, mientras tanto en esas etapas se observarán signos clínicos del proceso infeccioso.

b) La actividad combinada del sistema complemento y lisozima, provoca la inducción de estas formas en el organismo, sin embargo, ésto puede conducir ya sea a la lisis total de una bacteria o bien a inducción de formas L.

Lisozima, colicinas y aminoácidos que se eliminan del organismo a través del riñón en un momento dado, provocarían la inducción a formas L de la bacteria causante del padecimiento (17, 18, 19, 23, 25, 32, 35, 36, 40, 45, 46, 51, 54, 58, 70, 104).

3.2 Cuadro clínico de la pielonefritis:

La pielonefritis se caracteriza por inflamación del riñón y de la pelvis renal, generalmente bilateral, que se presenta como un síndrome infeccioso general agudo o atenuado.

Existen diversos factores predisponentes; entre los más comunes están la obstrucción de las vías urinarias y algunas enfermedades tales como diabetes, anemia perniciosa, distrofia del lactante, etc. Se presenta bajo dos formas, una aguda y otra crónica y ambas pueden ser obstructivas o no. La pielonefritis aguda es de iniciación brusca con escalofríos, temperatura, postración, dolor de cabeza, náuseas y a veces vómitos. Puede acompañarse de dolor en la región lumbar, abdomi-

nal superior o fosa hiliaca, la compresión del punto uretral superior provoca dolor intenso. Si la vejiga está afectada, se observa poliuria y disuria, además, en la orina, se presentan hemafes, albúmina, cilindros, etc. Evoluciona en un período de 5 a 7 días, con declinación de la fiebre y mejoría del estado general, tornándose normales las orinas en 3 ó 4 semanas, generalmente no hay daño histológico.

La forma crónica suele observarse después de una pielitis que acompañó al embarazo o proveniente de la infancia, así como también puede originarse por formas E bacterianas. Pueden observarse dos variedades: la no obstructiva y la obstructiva. En ambas, la fiebre es reducida pero prolongada, continúa con dolor de cabeza, falta de apetito, astenia, en ocasiones se presenta dolor lumbar. La alteración de la orina se caracteriza por la presencia de pus, albúmina, cilindros hialinos, gránulos, sangre, etc.

La pielonefritis crónica no obstructiva se caracteriza microscópicamente por una reacción inflamatoria crónica con linfocitos y células plasmáticas, atrofia tubular y dilatación con aspecto coloidal o gelatinoso, los glomérulos generalmente presentan fibrosis pieloglomerular y los efectos de la isquemia.

Los vasos sanguíneos en las áreas de inflamación pueden tener paredes engrosadas. La enfermedad se dice que es histológica

mente activa cuando además de dichos cambios, se encuentran leucocitos polimorfonucleares en el intersticio o en el lumen tubular.

No hay duda de que esta lesión puede desarrollarse de una pielonefritis bacteriana aguda y se asocia frecuentemente con una infección bacteriana crónica o recurrente. El examen histológico del tejido renal reveló que el 71% de los cultivos positivos de riñón tienen evidencia microscópica de pielonefritis crónica.

Existe la posibilidad de que la persistencia de las formas L pueda explicar el desarrollo de pielonefritis crónica en ausencia de formas bacterianas clásicas demostrables y ya sea debido a un leve estímulo inflamatorio de las formas L directamente o a la reversión intermitente a las formas bacterianas originales más patógenas, es que se podrían causar los cambios patológicos (24, 68).

3.3 Condiciones que favorecen la cronicidad:

a) La hipertonicidad de la médula renal, favorece la protección de las bacterias en su fase L, ya que como se mencionó anteriormente estos microorganismos necesitan de una protección osmótica para su supervivencia. En la orina también existe esa protección debido a que la osmolaridad es más alta de los 650 mOsm, osmolaridad que corresponde al -

10% de sacarosa contenida en los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de las formas L. En la orina, el pH de 5 provee aproximadamente la misma protección que una concentración 0.5M de NaCl, ésto es de poca importancia en caso de que exista suficiente protección osmótica.

- b) El tejido renal puede interferir con la acción bactericida del suero, se han presentado evidencias que sugieren que la formación intrarrenal de amonio inactiva al 4° componente del complemento. Los complejos inmunes del sistema del complemento generan un factor quimiotáctico para leucocitos polimorfonucleares y aunque toda bacteria es generalmente estimulador potente para la migración de leucocitos, algunas formas L pueden no serlo, puesto que no secretan los mismos compuestos y pueden carecer de antígenos superficiales u otras sustancias que median la respuesta inflamatoria.
- c) Si suponemos que las formas L son susceptibles a la fagocitosis, éstas podrían permanecer en condiciones ambientales en las que sean protegidas de los fagocitos o en las que la función fagocítica sea pobre. Para que exista fagocitosis efectiva se requieren superficies de contacto, debido a ésto, en sangre, fluido ascítico o en abscesos de cavidades, los microorganismos susceptibles a la fagocitosis pue

den pasar inadvertidos. En el medio ambiente hipertónico - de la médula renal la función fagocítica es muy poca o la - movilidad de los fagocitos es probable sea impedida en gran medida y las formas L sean capaces de sobrevivir.

- d) Algunas formas L pueden causar infecciones intracelulares - en el riñón, este sitio es otro refugio potencial para evitar su fagocitosis. Después de obtener un nicho protector, pueden ser capaces de causar enfermedad por producción de - toxinas o inmunógenos que resultan del tejido dañado o por causar directamente citotoxicidad.
- e) El riñón se distingue de otros órganos por su alta concen- tración de urea, que es un constituyente de la orina y que contribuye a la formación de microorganismos en fase L, és to es posible, si se encuentra presente además una cierta cantidad de NaCl (14, 23, 35, 109).

3.4 Presencia de microorganismos en fase L en infecciones re- nales:

Existen reportes que de los microorganismos que infectan el - tracto urinario en su forma bacteriana normal, tan solo los si guientes se han encontrado en su fase L en padecimientos renales: Proteus mirabilis, Escherichia coli y Staphylococcus aureus.

Se han realizado estudios exhaustivos para investigar el pa- pel de la ureasa de Proteus en la patogénesis de la pielone-

ritis en un intento para comprender cómo bacterias relativamente inocuas, pueden atacar selectivamente al riñón, todo es to en base a la alta concentración de urea en dicho órgano.

Se han obtenido evidencias de que la ureasa de Proteus es nefrotóxica y que ésto contribuye a su patogenicidad de dos formas:

- 1) Por crear alcalinidad (pH=8.2) en el riñón conduciendo a la necrosis del epitelio renal tubular y a la precipitación de $MgNH_4PO_4$ con formación de cálculos. El pH producido se debe a la acumulación de amonio después de la descomposición de urea por la ureasa de Proteus, alcalinidad que no se produce durante la infección renal causada por Escherichia coli o por Staphylococcus aureus.
- 2) Por presencia de un parasitismo selectivo intracelular y necrosis de los túbulos renales.

Los estados tempranos de la infección por Proteus en el riñón se caracterizan por proliferación densa de bacterias dentro del epitelio tubular cuando la concentración de urea es alta. Las impresiones teñidas de las células tubulares individuales, revelan que las colonias se desarrollan en el citoplasma. El desarrollo de Proteus en el epitelio tubular produce necrosis de las células, encontrándose se que estos túbulos dañados, son el centro de una reacción inflamatoria renal comenzando con unos cuantos leuco-

citos polimorfonucleares y posteriormente esta reacción peritubular aumenta para producir las lesiones masivas inflamatorias esferoidales corticopélvicas que son características de la pielonefritis causada por Proteus.

Las infecciones causadas por Staphylococcus aureus y Escherichia coli no se localizan en las células tubulares, sino fuera de los túbulos y extracelularmente.

El número de células infectadas por colonias de Proteus aumenta proporcionalmente con el aumento de la concentración de urea. A diferencia de Proteus, la infección de Escherichia coli es ligera y la concentración de urea no influye su desarrollo.

La alcalinidad producida por la ureasa al descomponer la urea, puede dañar al epitelio severamente aún en ausencia de bacterias viables. Escherichia coli, a diferencia de Proteus, produce acidez y casi no se presenta daño celular a pesar del gran desarrollo aún en concentraciones muy altas de urea.

Staphylococcus aureus también posee una potente ureasa, sin embargo, se ha observado que sólo se desarrollan fuera de las células tubulares.

El fenómeno de infección intracelular no solo ayuda a elucidar el desarrollo inicial de lesiones pielonefríticas, sino que también constituye una base para explicar porqué

Las infecciones por Proteus persisten en el riñón por períodos más largos que las causadas por Escherichia coli. Los estudios con cultivos de tejidos establecen que Proteus es protegido por las células epiteliales, de los procesos inmunológicos que podrían más fácilmente eliminarlos del tejido.

Estudios posteriores confirman los efectos neurotóxicos de la ureasa de Proteus en pielonefritis y la acción de esta enzima podría explicar no sólo la peculiar susceptibilidad del riñón a estas inofensivas bacterias, sino además, la resistencia a antibióticos y procesos inmunes naturales de Proteus, causando pielonefritis.

En base a estas observaciones, es fácil comprender la mayor incidencia de formas L de Proteus en comparación con formas L de otros microorganismos en las pielonefritis crónicas (3, 12, 14, 17, 23, 35, 44, 46, 49, 63, 65, 94, 99).

CAPITULO IV

SENSIBILIDAD DE LAS FORMAS L Y POSIBLE TERAPIA EN PADECIMIENTOS RENALES

Los patrones de sensibilidad a antimióticos de las formas L, como podría suponerse, difieren en gran medida de las bacterias originales en que las formas L, en general, son resistentes a agentes que actúan inhibiendo la síntesis de pared celular. Por lo tanto, las penicilinas, cefalosporinas y ciclosporinas no son efectivas contra esferoplastos y formas L.

Aunque la bacitracina, vancomicina y ristocetina inhiben la síntesis del peptidoglucano, estos antimióticos también inhiben algunas formas L, sugiriendo otra forma de acción que afecta posiblemente la membrana citoplásmica.

Antimióticos tales como la eritromicina no son efectivos contra muchas enterobacterias intactas, pero sí lo son en la inhibición de la síntesis de proteínas en esferoplastos o formas L derivadas de las bacterias originales. Este dato sugiere que la pared celular actúa como una barrera para la eritromicina, la cual desaparece con la pérdida de la integridad de la pared celular.

Observaciones similares se han hecho con la forma L de Proteus y el antimiótico polimixina.

Experimentalmente, se ha observado que la eritromicina es efectiva en la inhibición de esferoplastos y formas L de

Streptococcus faecalis inducidos por la penicilina, pero no en bacterias intactas causantes de pielonefritis en ratas. Se ha reportado también una sensibilidad similar de esferoplastos enterocócicos con kanamicina.

Cuando la pared celular es afectada por la penicilina, la estreptomycinina y la kanamicina son agentes bactericidas mucho más efectivos y las formas L de los microorganismos son considerablemente más sensibles a los aminoglucósidos que los microorganismos intactos.

4.1 Antibióticos efectivos contra las formas L

La recopilación de los resultados de diferentes experimentos in vitro, indican que las formas L generalmente son sensibles a los antibióticos que afectan la membrana citoplásmica y el metabolismo intermedio como son: eritromicina, kanamicina, tetraciclina, estreptomycinina, neomicina, cloramfenicol, polimixina B, leucomicina y gentamicina.

En todos los casos de pielonefritis de los que se han aislado formas L, se han obtenido resultados favorables en la erradicación de la enfermedad al aplicar al paciente una terapia combinada de un antibiótico que actúe sobre la forma bacteriana intacta (penicilinas, cefalosporinas y cicloserina) y otro sobre su forma L (tetraciclina, estreptomycinina, eritromicina, neomicina, kanamicina, cloramfenicol, polimixi

na B, leuconicina y gentamicina).

4.2 Terapia combinada

Las combinaciones más frecuentes encontradas en diferentes estudios fueron:

penicilina - eritromicina

penicilina - tetraciclina

penicilina - kanamicina

A su vez, de estas tres combinaciones, la más empleada en las pielonefritis crónicas que involucran a formas L es la de penicilina-eritromicina, su elección se debe a que reportes previos indicaron que la mayoría de las variantes en fase L son sensibles a este agente.

Consideramos que antes de prescribir una terapia combinada de antibióticos a pacientes en los que el padecimiento crónico - lo cause una bacteria determinada y su forma L, es necesario determinar la sensibilidad de los mismos. Esto es posible - por medio del antibiograma, por el método de difusión en placa de agar y apoyada en el de dilución en tubo.

La comparación de las normas de sensibilidad frente a los antibióticos de las formas L y la bacteria clásica, determinada por el método de discos, es un tanto difícil debido a que las formas L requieren cuatro días para que el desarrollo de las mismas sea adecuado, mientras que en la bacteria clásica re-

quiera sólo de 12 a 18 horas de incubación. Los diferentes diámetros de las zonas de inhibición pueden reflejar diferentes tiempos disponibles para la difusión del antibiótico; sin embargo, las diferencias de los diámetros de las zonas observadas son significativos, ya que la zona de inhibición de un antibiótico es marcadamente contrastante para ambos (bacteria clásica y su forma L).

Para ilustrar lo anterior, se mencionará el resultado de uno de los experimentos realizados en el que se determinó la sensibilidad de Proteus mirabilis clásico y su forma L, con respecto a penicilina y eritromicina:

	Penicilina Zona de inhibición (mm)	Eritromicina Zona de inhibición (mm)
<u>P. mirabilis</u> clásico	15	7
<u>Forma - L</u>	7	16

Este método se apoya con la técnica de diluciones seriadas de cada antibiótico, en las que la incubación con bajas concentraciones de eritromicina inhibió completamente el desarrollo subsecuente de formas L en subcultivo, mientras que éstos se desarrollaron aún después de la incubación con concentraciones altas de penicilina.

Este tipo de determinaciones es muy importante en la recuperación del paciente con padecimientos crónicos, ya que al apli-

car la terapia combinada adecuada, se estará disminuyendo en gran medida la posibilidad de la recurrencia, lo que no sucede cuando se elimina tan sólo la bacteria clásica y no su forma L, la cual persiste en el organismo y al ser suspendida la terapia con el antibiótico inductor, revertirá a su forma bacteriana causando recaídas intermitentes.

Se ha reportado en la literatura otro tipo de terapia para las pielonefritis de las que se han aislado formas L, y consiste en la preparación de una vacuna antigénica obtenida de dichas formas, la que administrada en dosis y período adecuados trae como consecuencia la erradicación de las mismas y, por lo tanto, la recuperación del paciente. Los inconvenientes principales de este método son el costo y tiempo de preparación de la vacuna antigénica (3, 9, 12, 19, 23, 35, 44, 45, 46, 56, 63, - 69, 94, 99).

CAPITULO V

DIAGNOSTICO CLINICO

El propósito de este capítulo es sugerir una técnica específica que se lleve a cabo en el laboratorio para la evaluación clínica de las enfermedades infecciosas del tracto urinario y la identificación de microorganismos aislados en cultivo.

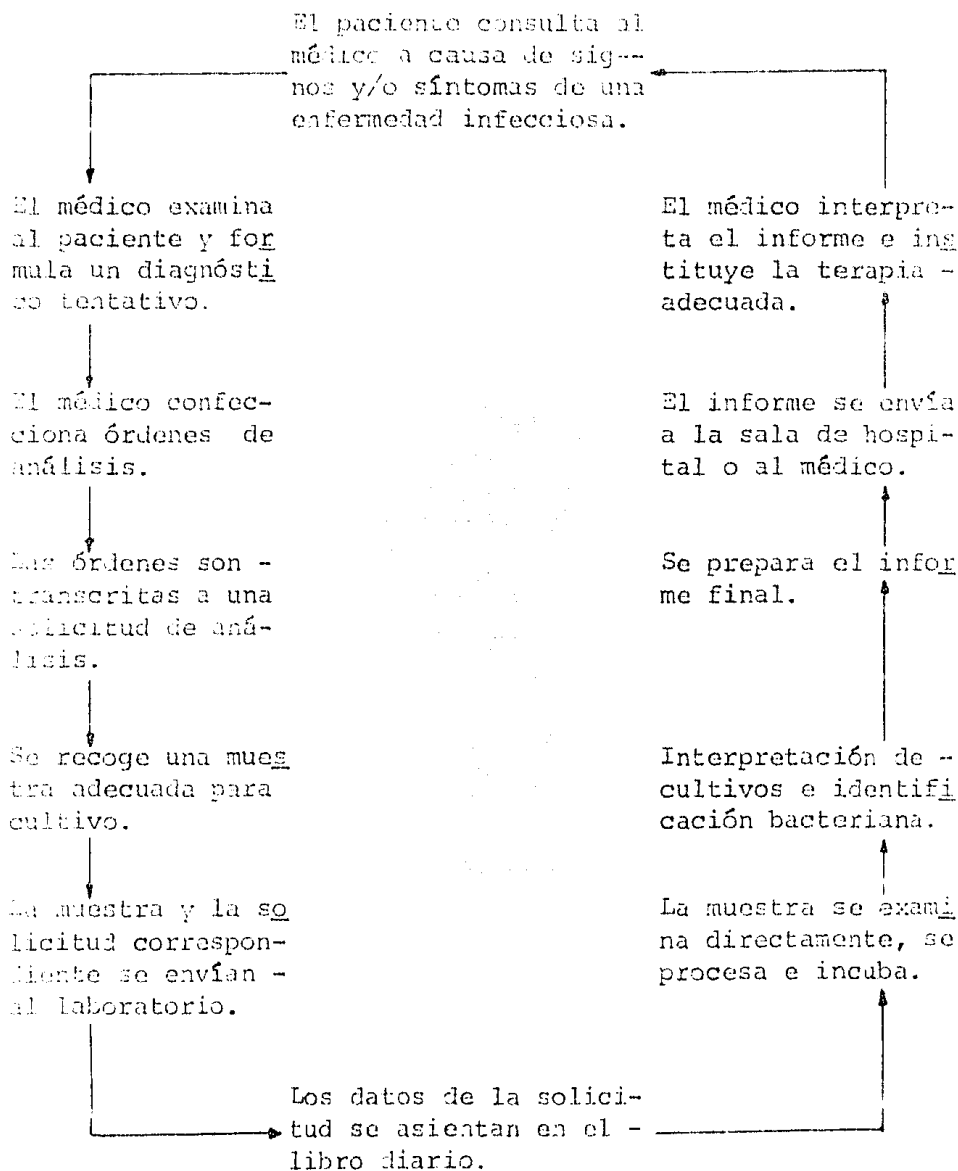
La principal función del laboratorio de Bacteriología Médica es la de ayudar al médico en el diagnóstico y tratamiento de pacientes con enfermedades infecciosas. Una vez que el médico examina al paciente, formula un diagnóstico tentativo, iniciando estudios a fin de confirmar o descartar dicho diagnóstico.

El médico debe conocer las diversas formas en que se puede -- presentar una enfermedad infecciosa, debe utilizar rayos X y pruebas y técnicas de laboratorio para confirmar su impresión clínica, deberá también prevenir al laboratorio de que se sospecha la presencia de ciertos microorganismos, en particular si para su aislamiento se requiere un medio de cultivo distinto de los comunmente utilizados (68).

La siguiente figura es una representación esquemática de la secuencia de etapas necesarias para la obtención de un diagnóstico clínico y de laboratorio de una enfermedad infecciosa en -- general.

3.1 Etapas necesarias para la obtención de un diagnóstico -- clínico y de laboratorio de una enfermedad infecciosa --

13 .



El diagnóstico de pielonefritis crónica no suele ser fácil, incluso en la autopsia, aunque el paciente tenga una historia

de pielonefritis aguda.

Los pacientes con infecciones subagudas o crónicas, pueden -- presentar síntomas sistémicos mínimos y/o signos sutiles como fiebre intermitente con poca elevación de la temperatura, p_ér-- dida de peso, fácil fatigabilidad y lasitud. El sedimento -- urinario puede contener intermitentemente leucocitos, bacte-- rias y cilindros epiteliales y purulentos; hematíes y cilin-- dros hemáticos se ven rara vez. El hallazgo de cilindros leu-- cocitarios es el más importante para establecer un diagnósti-- co de pielonefritis crónica.

Las células centelleantes (leucocitos grandes) son frecuentes en esta enfermedad, cuando se forma orina hipotónica. Es ha-- bitual una proteinuria menor de 2 g por día, pero el nivel -- puede ser más elevado. En la mayoría de los casos de pielong-- fritis crónica, el diagnóstico se establece con la historia, hallazgos urinarios, datos radiográficos y biopsia renal. Las dificultades diagnósticas acontecen cuando el paciente se pre-- senta con afectación de la función renal en ausencia de otros hallazgos (24, 68)

5.2 Sugerencia de una técnica a seguir para la investigación de formas L.

5.2.1 Toma de muestra (4, 6, 56, 68)

Conceptos básicos para la correcta recolección de muestras

- 1) La muestra de orina para cultivo debe obtenerse del verdadero sitio de infección y recolectarse con un mínimo de contaminación de tejidos, órganos o secreciones adyacentes, como podría ser el caso de que la higiene inadecuada del tejido parauretral y perineo, antes de recolectar una muestra de orina de una mujer, la contamine.
- 2) Establecer períodos óptimos para la recolección de muestras a fin de tener la mejor oportunidad de aislar a las formas L.

Las primeras muestras de orina recolectadas por la mañana, contienen habitualmente mayor concentración de formas L, debido a la inactividad del individuo durante la noche, además, la osmolaridad de la orina es elevada así como la concentración de urea.

- 3) Utilizar dispositivos de recolección, recipientes para las muestras y medios de cultivo adecuados para asegurar el óptimo aislamiento de la bacteria y de su forma L. Se deben emplear recipientes estériles para la recolección de muestras de orina. Es también importante que dichos recipientes estén contruídos para facilitar la recolección, particularmente si se requiere que los pacientes obtengan sus propias muestras. Los frascos de boca ancha son los más adecuados para la recolección de muestras de orina, deben estar también provistos de tapa de cierre hermético para -

evitar derrame o contaminación durante el traslado de las muestras.

En el caso de una aspiración suprapúbica se usará una jeringa y aguja estériles, teniendo cuidado de eliminar las burbujas insertando la aguja en un tapón de goma estéril. Sólo se debe utilizar si la muestra se puede enviar al laboratorio sin demora. Los tubos o frascos con tapa de goma para aspirados deberán contener 5 ml de solución de sacarosa al 20% estéril y saturado de CO₂ y libre de oxígeno para la búsqueda de anaerobios.

Al realizar una biopsia renal el tejido se puede colocar en un tubo con tapón de rosca y transportar en: a) el "minifrasco", un recipiente de 35 mm en el que se utilizan ligaduras de acero y CuSO₄ acidificado como absorbente de oxígeno, o bien, b) una bolsa de plástico con generador de gas para atmósfera anaerobia, catalizador e indicador.

- 4) El envase recolector de la muestra debe estar correctamente rotulado:
- a) Nombre completo del paciente.
 - b) Número de identificación que puede ser el número de hospital, clínica o consultorio.
 - c) Nombre del médico.
 - d) Especificar la procedencia de la muestra.
 - e) Indicar día y hora de la recolección de la muestra.

Técnicas de recolección de orina

Técnica de micción media (4, 56). Esta técnica se basa en las siguientes premisas:

- A) La recolección de la orina de la parte media de la micción, desechando el chorro inicial, esta operación tiene como finalidad producir el arrastre de la flora bacteriana residente en la uretra. A pesar de ésto, siempre pasan bacterias propias de la uretra con el chorro medio (menos de 10,000 - colonias por ml).
- B) Para poder diferenciar la pequeña cantidad de microorganismos que pasan en el chorro medio de la orina normal, de las bacterias que pueden estar presentes en la vejiga (sea por infección vesical o llegados a aquélla por los uréteres provenientes de una infección de pelvis o parénquima renal), se recurre al recuento de colonias.

En definitiva, el método del chorro medio con recuento de colonias exige que: 1) se efectúe una recolección correcta en la que no exista otra fuente de contaminación que no sean los microorganismos propios de la uretra. 2) la orina vesical sea un buen medio de cultivo (pH) osmolaridad y concentración de nutrientes apropiados y ausencia de inhibidores. 3) se consiga una retención vesical de 3 horas como mínimo.

Función suprapúbica (P.S.P.)

Las ventajas de la recolección de orina por P.S.P. son las siguientes:

- a) Se llega en forma directa a la orina vesical sin correr el peligro de contaminación uretral y sin el riesgo de la infección que ocasiona el catéter.
- b) Se elimina la necesidad de efectuar el conteo de colonias porque las bacterias que se aíslan provienen de modo directo de la vejiga y no existen dudas de la existencia de infección, excepto de la misma.
- c) Al no efectuarse recuento de colonias puede prescindirse de la obligación de procesar la orina de inmediato o de refrigerarla.
- d) Por provenir de una zona por lo regular aséptica (la vejiga) es posible además efectuar una siembra en medio líquido, la que podrá revelar la presencia de bacterias en la vejiga, que se encuentren a muy baja concentración.

La punción suprapúbica debe practicarse por un médico con experiencia en esta técnica. El paciente se coloca en decúbito horizontal supino con las piernas en abducción. La etapa más importante es verificar que la vejiga se encuentre llena. Si se coloca de costado a los lactantes se obtendrá un número -- elevado de punciones infructuosas y se dañará inútilmente al

niño. La forma más segura y eficaz de verificar el llenado vesical es la percusión abdominal la que debe efectuarse cada hora hasta encontrar el sonido suprapúbico característico. Luego se esteriliza la zona de punción con alcohol yodado o mertiolate y se lava al niño la zona genital para posibilitar la recolección de la orina que con frecuencia se emite en forma simultánea al practicar la punción. Para efectuarla se usa una jeringa de 10 ó 20 cc y aguja 40/7. Se punciona de 1 ó 2 cm por encima del pubis y en la línea media. Inicialmente se efectúa la punción en forma vertical y cuando se atravesó la pared abdominal se dirige la aguja hacia el cóccix con una inclinación de 10° y en movimiento continuo. La orina suele entrar sola en la jeringa antes de comenzar a aspirar.

En tal caso se continúa aspirando con suavidad para evitar que el bisel de la aguja se adose a la pared de la vejiga y no salga más orina. Terminada la recolección se retira la aguja en un solo movimiento rápido y se limpia el orificio de entrada con el mismo desinfectante usado al principio. La orina se pasa en forma aséptica e inmediata a un tubo estéril con tapa hermética.

El sólo diagnóstico de bacteriuria no indica si la infección está confinada al tracto urinario bajo o si envuelve a los riñones. En ciertos pacientes la información del panorama es --

importante debido a la terapéutica necesaria para erradicar la infección (6, 56).

5.1.3 Transporte y conservación de la orina (4, 6, 56).

La orina recolectada debe refrigerarse inmediatamente colocando el frasco en un refrigerador, entre 4° y 8°C (nunca en el congelador). Si la orina debe transportarse a distancia, puede disponerse de un recipiente de material aislante en el que se coloca el frasco, rodeándolo de cubitos de hielo. La orina puede permanecer 24 horas en refrigeración sin que ocurran modificaciones significativas en el recuento bacteriano. La refrigeración de la orina tiene por objeto el impedir la reproducción bacteriana en la orina contenida en el recipiente en que se recolectó. El tiempo de generación de las bacterias que producen infección urinaria es tanto más cercano a los 20-30 minutos cuanto más próxima sea la temperatura a los 37°C; a 20°C, el tiempo de generación de las enterobacterias puede considerarse próximo a los 45'. Ello significa que cada 45' que transcurren estando la orina a dicha temperatura, la población bacteriana se duplica.

5.2.3 Métodos directos adecuados para localizar una infección urinaria (56, 59, 109).

a) Biopsia renal

b) Cateterización ureteral.

c) Técnica de Fairley.

Estos métodos son ordinarios y se basan en el hallazgo de bacterias en el riñón en forma directa o bien mediante procedimientos que permiten deducir ese origen.

5.2.3.1 a) Biopsia renal:

Su valor en la pielonefritis es limitado por la disposición discontinua o en placas de las bacterias, dando una distribución dispersa de las lesiones que determinan la posibilidad de resultados falsos negativos. Los positivos, sin embargo, certifican una infección bacteriana renal.

5.2.3.2 b) Cateterización ureteral:

Se basa en la recolección de orina de ambos uréteres con la finalidad de presuponer la localización renal de los microorganismos y determinar cuál de los riñones está infectado. Este método tiene el inconveniente de requerir una maniobra urológica especializada y de ofrecer el riesgo de una posible contaminación ureteral bacteriana de origen vesical.

5.2.3.3 Técnica de Fairley, Bond, Brown y Habersberg o del lavado vesical.

En esta técnica se coloca un catéter en la vejiga, previa higiene perfecta de los genitales (ver metodología de la reco-

lección) a través de la uretra y se deja colocado recolectando orina (muestra No. 1). Entonces se introducen en la vejiga 50 ml de una solución de neomicina (0.1%) que contenga dos ampollas de Parkelase (una ampolla contiene 25 U de fibrinolisisina bovina y 15.000 U de desoxirribonucleasa) a través del catéter y se deja en la vejiga durante 30 min. (Luego recoger la orina, muestra No. 2) El Parkelase se utiliza para remover el exudado fibrinoso de la pared vesical, mientras que la neomicina esteriliza el contenido de la vejiga. Entonces se lava la vejiga con 2 litros de agua destilada estéril. Las muestras de orina se obtienen desde la cateterización inicial, luego del lavado vesical y a los 0 a 10 (muestra No. 3), 10 a 20 (muestra No. 4) y 20 a 30 minutos (muestra No. 5) luego del lavado. Los pacientes con una infección localizada en la vejiga presentarán una orina estéril en todas las muestras recogidas después del lavado (muestras 2-3-4-5 estériles). Los pacientes con una infección renal (alta) presentarán bacteriuria (por lo general más de 1,000 y a menudo más de 10,000 por ml) en cada una de las muestras extraídas después del lavado. Todas las muestras se someterán a recuento de colonias e identificación de acuerdo con la metodología descrita más adelante. La técnica de Fairley se utiliza ahora como método patrón para evaluar la eficacia de los métodos indirectos y tiene la ventaja de que no necesitan realizarlo expertos en uro-

logía. Sin embargo, no es de utilidad para diferenciar cuál de los riñones está infectado. Un rasgo característico es que los pacientes que sólo presentan bacteriuria vesical pueden ser curados de este episodio infeccioso con el lavado vesical (56).

5.2.4 Métodos indirectos:

Los métodos indirectos sólo pueden evaluarse mediante comparación con los métodos directos ya que la relación de los primeros con el criterio clínico de localización, no permite extraer conclusiones válidas (56).

5.2.4.1 Prueba de concentración renal:

La incapacidad para concentrar la orina por encima de 700 mOsm/Kg de agua, denota participación renal y es la prueba indirecta de mayor uso en la práctica clínica.

5.2.4.2. Importancia del serotipo del microorganismo infectante:

Este punto se explicará más adelante.

5.2.4.3 Respuesta de anticuerpos al microorganismo infectante:

Desde el punto de vista teórico, los pacientes con infección renal que causan migración de células mononucleares y polinu-

elevarse al área enferma, con producción de anticuerpos por parte de células inmunocompetentes, deberían experimentar elevación del título de anticuerpos séricos.

Si la infección queda restringida a la vejiga, los pacientes con infección urinaria vesical tienen una menor respuesta inflamatoria y por tanto es menor el aumento del título de anticuerpos del suero.

5.2.4.4 Excreción de enzimas urinarias:

Las enzimas que en un comienzo infundieron grandes esperanzas, no han resultado útiles en la diferenciación de la localización de las infecciones urinarias. Brunfitt trabajando con *β*-glucuronidasa no pudo encontrar correlación entre el índice de excreción enzimática y las pruebas para localizar la infección.

5.2.4.5 Función glomerular:

Otra prueba de utilidad para comprobar la falla en la función renal es la determinación del índice de depuración de creatinina endógena, que mide la capacidad de filtración glomerular. Esta se encuentra muy disminuida (por debajo de 80 ml/minuto) cuando hay daño renal.

5.2.4.6 Presencia de antígeno K:

Numerosos investigadores han sugerido que las cepas ricas en

antígeno K son más capaces de invadir el riñón. Esto puede deberse a la acción inhibitoria de los antígenos K sobre el complemento y la fagocitosis (24, 56).

Importancia de la identificación del agente etiológico aislado de orina (19).

La identificación de los microorganismos aislados de la orina tiene como objetivos:

- a) Determinar el agente etiológico del proceso.
- b) Reconocer la presencia de bacterias habituales contaminantes (ejemplo: Staphylococcus epidermidis, Micrococcus -- sp., etc).
- c) Al efectuarse cultivos de muestras dobles o triples, precisar si el agente aislado en cada una de ellas es el mismo.
- d) Comprobar durante la evolución de la enfermedad si las recaídas se deben a reinfecciones, o bien a persistencia -- del microorganismo inicial.

Los recursos de los cuales dispone el bacteriólogo para determinar si el mismo agente bacteriano está implicado en los cultivos sucesivos, efectuados a un mismo paciente, son los siguientes:

- a) Biotipo. Consiste en identificar al microorganismo si se estudia la mayoría posible de pruebas relacionadas con diferentes mecanismos enzimáticos de la bacteria.
- b) Antibiotipo. La determinación de la sensibilidad a anti--

bióticos, frente a una cepa bacteriana, es un excelente marcador genético. Así es posible inferir que se está en presencia de cepas iguales, cuando a partir de dos cultivos de orina realizados uno tras otro, con breve intervalo y sin que medie entre ellos ningún tratamiento antibiótico, las cepas aisladas presenten la misma sensibilidad.

- c) Serotipo. Se da el caso no obstante, de que dos cepas pueden presentar el mismo biotipo y antibiotipo y ser serológicamente distintas por diferir en la naturaleza de sus antígenos. Por ésto, la determinación del serogrupo se ha impuesto en muchos centros especializados.
- d) Determinación del título de anticuerpos frente a dos cepas aisladas de cultivo sucesivos y sin tratamiento interrecurrente. Estas cepas pueden ser también de utilidad para diferenciar cepas.

5.2.5 Criterios de Kass (6).

1. Un cultivo menor o igual a 10^3 bacterias/ml, de orina; se considera como cifra insignificante o contaminación.
2. En un cultivo menor o igual a 10^4 bacterias/ml de orina se recomienda repetir el análisis.
3. Un cultivo mayor de 10^5 bacterias/ml de orina indica una infección activa del aparato urinario.

Las cifras entre estas cantidades se consideran como de signi-

ficación variable, según el tipo de microorganismo y el cuadro clínico del paciente. Estos criterios resultan válidos sólo para muestras recogidas adecuadamente.

5.2.5.1 Criterio de bacteriuria significativa (4, 6, 24, 56).

- a) Un cultivo monomicrobiano mayor de 10^5 bacilos Gram negativos/ml con sedimento anormal y/o anticuerpos significativos frente a la propia cepa.
- b) Dos cultivos monomicrobianos mayores de 10^4 bacilos Gram negativos/ml, biotipo, antibiograma y si es posible serogrupos iguales.
- c) Cualquier valor de bacilos Gram negativos/ml en 2 cultivos con anticuerpos significativos.
- d) Dos cultivos monomicrobianos mayores a 10^4 cocos Gram positivos/ml con igual biotipo y antibiograma.
- e) Tres cultivos polimicrobianos mayores a 10^4 bacterias/ml con igual biotipo y antibiograma.
- f) Cualquier valor hallado por punción suprapúbica.

5.2.6 METODOLOGIA :

En general la metodología a seguir se basa en un análisis paralelo del urocultivo clásico, con la investigación de formas L con el fin de identificar al agente causal.

A continuación se presenta un esquema del análisis propuesto:

TOMA DE MUESTRA *

Refrigeración o procesamiento inmediato

- a) Recuento de colonias { 1) Método de dilución en placa
2) Método del asa calibrada
b) Densidad
c) Proteínas
d) pH
e) Sedimento { 1) Examen en fresco
2) Coloración de Gram

Aislamiento en medios

Aerobiosis

Anaerobiosis

G.S. B.H.I. A. Casoy

**

- a) Coloración de Gram
b) Pruebas bioquímicas
c) Antibiograma
d) Pruebas serológicas

Interpretación de resultados

Filtración a través de filtro millipore o sartorius de 0.45 μ m

Dilución en solución de sacarosa al 20 % estéril M.L.C.

Cultivo del filtro en - G.S. y - B.H.I.

Siembra directa

**

M.L. M.L.S.A.

- a) en O₂
b) en CO₂
c) en Anaerobiosis

Positivo a A.L.

- a) Coloración de Gram
b) Pruebas bioquímicas
c) Antibiograma
d) Pruebas serológicas

Resiembra Frotis (Gram)

A.L. A.L.S.A. Placa

Inducción a la Reversión M.L.R.

Antibiograma de la forma L

- G.S.: Agar Gelosa Sangre
BHI: Infusión cerebro corazón
M.L.: Medio difásico "L" con antibiótico
M.L.S.A.: Medio difásico "L" sin antibiótico
PLACA: Medio "L" agar en placa
M.L.C.: Medio "L" caldo
M.L.R.: Medio "L" de reversión

* La elección del método es a criterio del analista tomando en cuenta las ventajas y desventajas señaladas anteriormente.

Requerimientos que deben cumplirse para determinar la patogenicidad de una variante bacteriana.

El aislamiento de bacterias con pared celular deficiente no constituye por sí una evidencia de que la variante aislada determine la patología del proceso.

Para comprobar la patogenicidad de una variante bacteriana debe cumplirse lo siguiente:

- 1) Comprobar si hay bacterias normales de la misma especie -- que la variante revertida en el material en estudio.
- 2) Intentar la obtención repetida de la variante bacteriana - del mismo material en muestras seriadas.
- 3) Determinar si hay respuesta inmunológica del paciente frente a la cepa revertida.
- 4) Observar si la erradicación del microorganismo aislado se acompaña de una disminución significativa de la patología.
- 5) Organismos en la clásica fase bacteriana en un espécimen - puede sufrir "espontáneamente" transición a una fase de pared defectuosa cuando se cultiva en un medio hipertónico - libre de antibiótico. Esto es especialmente probable si - contiene penicilina u otras sustancias que actúan a nivel de pared celular.
- 6) Se prueba que las variantes de pared defectuosa existen como tal en materiales clínicos. Deberán incluir visualización de las variantes en el espécimen (por ejemplo por - -

fluorescencia, luz o microscopio electrónico) y demostrar que tienen características consistentes con la fase variante designada.

- 7) Si el microorganismo presenta una variante, el siguiente paso es determinar si esa especie está relacionada al proceso de enfermedad o simplemente como saprofito.
- 8) Microorganismos de la misma especie de los aislados, deberán estar presentes en el foco infeccioso (19, 24, 56, 59, 68, 75, 103, 109).

D I S C U S I O N

Debe hacerse notar que, en general, esta investigación bibliográfica inicialmente involucraba la importancia de las formas L en todo el tracto urinario, sin embargo, después de una intensa recopilación de datos se llegó a la conclusión de que -- es específicamente en el riñón donde las formas L tienen mayores probabilidades de formación y de protección debido a los factores, condiciones y características propias del mismo, -- que se citaron anteriormente. Esto hace que el enfoque de este trabajo se dirija a las pielonefritis crónicas.

Se ha considerado que las formas L no son patógenos primarios, sino formas sobrevivientes con capacidad de revertir a su forma bacteriana original y, por lo tanto, responsables de la -- cronicidad del padecimiento, aunque se ha demostrado que en -- condiciones muy específicas, son capaces de producir patogenicidad por continuar el metabolismo y producción de toxinas e inmunógenos que dañan el tejido o por causar directamente citotoxicidad, ya que muchas formas L derivadas de microorganismos Gram negativos son tóxicas, debido a que el material residual de la pared celular está frecuentemente presente en la -- cubierta de las mismas, causando dichas lesiones demonecróticas.

Se observó además que el microorganismo de mayor incidencia -- en pielonefritis crónicas en su fase L es Proteus mirabilis --

debido a la producción de ureasa que aumenta el pH por acumulación de NH_4 debido a la descomposición de la urea, conduciendo a la necrosis renal tubular y a la formación de cálculos. Además, el parasitismo selectivo intracelular de Proteus en el epitelio tubular, produce necrosis de las células correspondientes dando como consecuencia lesiones masivas inflamatorias esferoidales corticopélvicas, que son características de las pielonefritis causadas por Proteus. Estos efectos no se producen durante la infección renal causada por otros microorganismos, cosa que explica no sólo la peculiar susceptibilidad del riñón a estas bacterias, sino además, la resistencia a antibióticos y procesos inmunes de Proteus, siendo fácil comprender la mayor incidencia de formas L de este microorganismo en comparación con la encontrada de otros microorganismos en las pielonefritis crónicas.

Una de las principales causas de la cronicidad de las pielonefritis se debe a una terapia inadecuada o masiva con antibióticos que favorecen la producción de formas L y debido a que los patrones de sensibilidad de éstas difieren en gran medida a la de las bacterias originales, es necesario tomar en cuenta este criterio para evitar la cronicidad.

Se considera que es de suma importancia el llevar a cabo una técnica en la que se aislen tanto la forma L como la bacteria de la cual derivó, para determinar paralelamente la sensibilidad

de las mismas y prescribir la antibioticoterapia combinada adecuada, lo cual es de suma importancia en la recuperación de pacientes con padecimientos crónicos ya que se estará disminuyendo con mayor medida la posibilidad de la recurrencia y la erradicación de ambas fases bacterianas y, por lo tanto, de la enfermedad.

CONCLUSIONES

- 1) Debido a las características propias del riñón, existe mayor probabilidad de formación y protección de las formas L.
- 2) Las formas L son responsables de la cronicidad del padecimiento por su capacidad de revertir a su forma bacteriana original.
- 3) Estos microorganismos, en condiciones muy específicas, se consideran patógenos primarios por producir toxinas y causar directamente citotoxicidad.
- 4) La forma L de Proteus mirabilis es el agente causal de mayor incidencia en pielonefritis crónicas.
- 5) La peculiar susceptibilidad del riñón a Proteus mirabilis, se debe a acumulación de amonio y al parasitismo selectivo intracelular.
- 6) En pacientes que presentan un cuadro clínico de pielonefritis crónica infecciosa, es recomendable llevar a cabo la investigación de formas L.
- 7) La producción de formas L se favorece debido a una antibioterapia inadecuada.
- 8) Para evitar la cronicidad, es necesario determinar paralelamente la sensibilidad de las formas L y de las bacterias de las cuales proceden, para prescribir una antibioterapia adecuada.

A N E X O

Composición de medios de cultivo (14, 19, 23, 30, 35, 49, 107)

Medio "L" Caldo

Sacarosa	200.00 g
Fitona	20.00 g
NaCl	5.00 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	3.30 g
Agua destilada (c.b.p.)	1000.00 ml

Se ajusta el pH a 7.8 con NaOH 1N y se esteriliza a 121° 15 minutos.

Se enfría a 45° y se agrega:

Extracto de levadura	10.00 g
Penicilina (1000 U/ml)	10.00 g
Anfotericina (2500 microgramos/ml)	2.00 g

Adicionar 2 ml de suero de caballo inactivado por cada 8 ml de medio base.

Para hacer tubos con medio bifásico se agregan 3 ml de medio - agar, se deja enfriar inclinando los tubos y una vez solidificado el medio se le adiciona 1 ml de caldo.

Medio "L" Agar

Sacarosa	100.00 g
Fitona	20.00 g
NaCl	5.00 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	3.30 g
Ión Agar No. 2	10.00 g
Agua destilada (C.B.P.)	1000.00 g

Se ajusta a pH 7.8 con NaOH 1 N y se esteriliza a 121° por 15 minutos. Se enfría a 45° y se le adicionan:

Extracto de levadura	10.00 ml
Penicilina (1000 U/ml)	10.00 ml
Anfotericina (25000 microgramos/ml)	2.00 ml

Preparación de Placas (19).

Se adicionan 2 ml de suero de caballo inactivado (SCI) por cada 3 ml de medio base.

Preparación de medio agar para tubos bifásicos.

Adicionar 1 ml de SCI por cada 3 ml de medio base.

Medio "L" de Reversión
(cantidades para 100.0 ml)

Substan- cias	LMR-1	LMR-2	LMR-3	LMR-4	LMR-5	LMR-6	LMR-7	LMR-8
- A -								
BHL	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7
Agar (g)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Sacarosa (g)	10.0	7.5	5.0	5.0	2.5	2.5	1.0	0.0
- B -								
SCI (ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	2.5	2.5	1.0	0.0
Extracto de leva- dura (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	0.25	1.0	0.0
Penicili- na (1000 U/ml) (ml)	1.0	1.0	1.0	0.5	0.125	0.05	0.01	0.0

LMR:

Medio "L" de reversión

Medio "L" agar:

Para placas y tubos bifásicos

Medio "L" caldo: No se le adiciona agar

A: antes de esterilizar

B: Después de ajustar el pH a 7.2 - 7.4 y esterilizar a 121° 15 minutos, se agrega el resto de constituyentes del medio.

Agua destilada (c.b.p.) _____ 100.0 ml

Identificación y cultivo de formas atípicas bacterianas (14, 19, 35).

Los tubos bifásicos de medio de "L" inoculados, se incuban a 37° durante 30 días, revisándose diariamente al microscopio - invertido con el objeto de certificar desarrollo. Una vez -- que hay desarrollo en los tubos de siembra directa se resiembra nuevamente a tubos bifásicos y placas, con el objeto de - comprobar la presencia de formas atípicas bacterianas. Se ha ce una tinción de Gram.

Identificación de formas L (2, 23, 25, 27).

- 1) Identificación de la bacteria revertida.
- 2) Clasificación inmunológica por medio de la técnica de inhi bición del crecimiento.
- 3) Estudios del ADN.
- 4) Electroforesis en gel.
- 5) Tinciones permanentes de preparaciones de agar.

Esta última técnica permite la preparación de placas permanen tes de formas L que permiten ser examinadas a una amplifica--

ción más alta que la que es posible en una observación directa.

Los cultivos se exponen durante toda la noche al vapor de una solución de formaldehído al 37% colocado en una pieza de papel filtro en la tapa de una caja petri invertida y sellada.

Las tinciones se llevan a cabo con azul II, azul de toluidina, tionina y safranina mezclándose con una solución de ácido tartárico al 20% y extendiéndose suavemente sobre el cubre objetos secándolo y calentándolo entre 50 y 60°C, se realizan cortes delgados de la superficie del bloque de agar con un microtomo y se monta en Bálzamo de Canadá.

Los cuatro incisos anteriores se explicaron en el capítulo -- No. 1.

B I B L I O G R A F I A

- 1) Altenbera, R.A., Landman, O.E. "Growth of L-forms of Proteus mirabilis in liquid media". J. Bacteriol. 79/510-518 (1960).
- 2) Anderson, J.R. "Acid treatment modification for the preparation of permanent slides of L-forms and mycoplasmas". J. Bacteriol. 93/1/493-494 (1967).
- 3) Angell, M.E., Relman, A.S., Robbins, S.L. "Active chronic - pyelonephritis without evidence of bacterial infection". N. Engl. J. Med. 278/24/1303-1308 (1968).
- 4) Bailey, R.W., Scott, G.E.
DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO
3a. Edición
Editorial Panamericana
Buenos Aires (1973).
- 5) Bandur, B.M., Diones, L. "L-forms isolated from a strain of Serratia". J. Bacteriol. 86/829-836 (1963).
- 6) Barry, L.A., Smith, B.P. Turck, M.
LABORATORY DIAGNOSIS OF URINARY TRACT INFECTIONS
II Cumitech
American Society for Microbiology
Washington (1975).
- 7) Basserman, J., Carrere, L., Pasquelle, R., Hauduroy, P., Kjieneberger-Nobel, E., Ponso, G., Roux, J., Tuncman, Z.M.
"L-forms of bacteria". Nature. 179/461-462 (1957)
- 8) Best, G.K., Durham, E.N. "Vancomycin absorption to Bacillus subtilis cell walls". Arch. Biochem. Biophys. 111/ 685-691 (1965).
- 9) Boyd, F.R.
BASIC MEDICAL MICROBIOLOGY
Brown and company
Boston (1979).
- 10) Boyden, S. "The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes". J. Exp. Med. 115/453-466 (1962).

- 11) Brady, J.R.
EL SISTEMA UREMIARIO
Editorial Limusa, S.A.
México (1980).
- 12) Braude, A.I., Shapiro, A.P., Siemieniowski, J. "Relationship of bacterial species to the pathogenesis of acute pyelonephritis". J. Bacteriol. 77/370-380 (1959).
- 13) Braude, A.I., Siemieniowski, J. "Protoplast formation in human urine". Trans. Ass. Amer. Physicians. 74/234-245 - - (1961).
- 14) Braude, A.I., Siemieniowski, J. "Role of bacterial urease in experimental pyelonephritis". J. Bacteriol. 80/171-179 - (1960).
- 15) Brenner, S., Dark, F.A., Gerhardt, P., Jaynes, M.H., Kandler, O., Klieneberger-Nobel, E., Quillen, K.Me., Rubio-Hertlos, M., Salton, M.R., Strange, R.E., Tomcsik, J., Weibull, C. "Bacterial protoplasts". Nature. 181/1713-1715. (1958).
- 16) Burnett, W.G.
REVIEW OF PATHOGENIC MICROBIOLOGY
The C.V. Mosby Company
Saint Louis (1974).
- 17) Calderón, J.E. "Formas L un nuevo concepto sobre la etiología de algunas infecciones". Bol. Med. Hosp. Infantil. 26/483-492 (1969).
- 18) Calderón, J.E., Albuérne, A., González, S. "Presencia de formas bacterianas atípicas L en infecciones humanas". Bol. Med. Hosp. Infantil 77/839-846 (1973).
- 19) Curreñó, M.E.
Formas bacterianas atípicas en ostiomielitis.
USAM., México., 1971
- 20) Charache, P., Kaslik, D. "Isolation of protoplast in human infection". Clin. Res. 13/293-298 (1965)..
- 21) Charache, P., Cole, L.B.
MICROBIAL PROTOPLASTS, SPIEROPLAST AND L-FORMS
Atypical bacteria forms in human disease.
Williams and Wilkins Co.
Baltimore (1967).

- 21) Chatman, N.S., et al. "L-forms in blood cultures demonstrated by nucleic acid fluorescences". Am. J. Clin. Path. 51/41-52 (1969).
- 22) Clasen, H. "Pathogenicity of the L-phase of bacteria -- 1583". Ann. Rev. Microbiol. 5/26/55-84 (1972).
- 23) Davidsohn, I., Bernard, J.H.
DIAGNOSTICO CLINICO POR EL LABORATORIO
6a. Edición.
Editorial Salvat, S.A.
Barcelona (1978)
- 24) Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, N.H., Ginsberg, H.S., -
Wood, B.W., McCarty, M.
MICROBIOLOGIA
2a. Edición
Editorial Salvat
México (1978).
- 25) Dienes, L. "L-organism of Klieneberger and Streptobacillus moniliformis". J. Infect. Dis. 65/24-30 (1939)
- 26) Dienes, L. "Permanent stained agar preparation of Mycoplasma and L forms of bacteria". J. Bacteriol. 93/2/689-692 (1967)
- 27) Dienes, L., Bullivant, S. "Comparison of the morphology of PPLO and L-forms of bacteria with light and electron microscopy". Ann. N.Y. Acad. Sci. 143/719-722 (1967).
- 28) Dienes, L., Edsall, J. "Observations of L-organism of Klieneberger". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 36/740-745 (1937).
- 29) Dienes, L., Sharp, J.T. "The role of high electrolyte concentration in the production and growth of L-forms of bacteria". J. Bacteriol. 71/208-213 (1955).
- 30) Dienes, L., Smith, W.E. "Reproduction of bacteria from the large bodies of Bacteroides funduliformis". Proc. Soc. -- Exp. Biol. Med. 51/297-306 (1943).
- 31) Eaton, D.M. "Pleuroneumonia-like organisms and related -- forms". Ann. Rev. Microbiol. 19/379-406 (1965).
- 32) Edward, D.G., Klieneberger-Nobel, E., Dienes, L., Freundt, E.A., Rubio, H.M. "Discussion". Ann. N.Y. Acad. Sci. 79/492-498 (1960).

- 34) Feingold, D.S. "Antimicrobial chemotherapeutic agents. N. Engl. J. Med. 269/909-907 (1963).
- 35) Feingold, D.S. "Biology and pathogenicity of microbial -- spheroplasts and L-forms". N. Engl. J. Med. 281/1159-1170 (1969).
- 36) Feingold, D.S. "The nature of the action and selective toxicity". N. Engl. J. Med. 269/957-964 (1963).
- 37) Fitz-James, P.C. "Cytological and chemical studies of the growth of protoplasts of Bacillus megaterium". J. Biophys. Biochem. Cytol. 4/257-266 (1958).
- 38) Fitz-James, P.C. "Electron microscopy of Bacillus megaterium undergoing insolation of it's nuclear bodies". J. - Bacteriol. 87/1202-1209 (1964).
- 39) Fitz-James, P.C. "Fate of the mesosomes of Bacillus megaterium during protoplasting". J. Bacteriol. 87/1483-1492 (1964).
- 40) Ghuyesen, J.M. "Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell wall metabolism". Bacteriol. Rev. 32/425-432 (1968).
- 41) Gilpin, W.R., Patterson, K.S., Knight, A.R. "Quantitation of Bacillus subtilis L-form growth parameters in batch culture". J. Bacteriol. 145/651-653 (1981).
- 42) Gleckman, R., Esposito, A., Madoff, S. "Fever of unknown origin: Attempts to isolate L-forms and other aberrant bacterial forms". J. Clin. Microbiol. 5/2/225-226 (1977).
- 43) Goldzinski, C.W. "The interactions of antibiotics, bacteria L-phase in vivo". Ann. N.Y. Acad. Sci. 143/769-772 - (1967).
- 44) Goldzinski, C.W., Brier, G. Griffiths, R.S. "Association of bacteria L-phase organisms in chronic infections". Nature 205/1340-1343 (1965).
- 45) Graham, S., Wilson, S.
PRINCIPLES OF BACTERIOLOGY VIROLOGY AND IMMUNITY
The Williams and Wilkins Co.
Baltimore (1975).

- 46) Guttman, L.T., Schaller, J., Wedgwood, R.J. "Bacteria L-Forms in relapsing urinary-tract infection". Lancet. - 1/464-478 (1967).
- 47) Guttman, L.T., Turck, M., Petersdorf, R.G., Wedgwood, R. J. "Significance of bacterial variants in urine of patients with chronic bacteriuria". J. Clin. Invest. 44/ 1945-1954 (1965).
- 48) Guze, L.B., Goldsensi, C.W.
MICROBIAL PROTOPLAST SPHEROPLAST AND L FORMS
Williams and Wilkins C.
Baltimore (1968).
- 49) Guze, L.B., Kalamanson, G.M. "Persistence of bacteria in protoplast from after apparent cure of pyelonephritis in rats". Science. 143/1340-1351 (1964).
- 50) Ean, W.A.
TRATADO DE HISTOLOGIA
7a. Edición
Editorial Interamericana
México (1975).
- 51) Hawker, E.L., Linton, H.A.
MICRO-ORGANISMS FUNCTION, FORM AND ENVIRONMENT
2nd. Edition
Edward Arnold Ed.
London (1979).
- 52) Hayflick, L.
THE MYCOPLASMATALES AND THE L-PHASE OF BACTERIA
North-Holland Publishing Co.
Amsterdam (1969).
- 53) Hijmans, W., Kastelein, M.J. "The production of L-forms of enterococci". Ann. N.Y. Acad. Sci. 79/371-373 (1960)
- 54) Hofschneider, P.H., Martin, H.H. "Diversity of surface layers in L-forms of Proteus mirabilis". J. Gen. Microbiol. 51/23-33 (1968).
- 55) Hugh, L.M.
CLINICAL MICROBIOLOGY
Lippincott Company
Philadelphia (1978)

- 56) Iovine, E., Selva, A.A.
EL LABORATORIO EN LA CLINICA
2da. Edición
Editorial Médica Panamericana
México (1970).
- 57) James, A.M., Hill, M.J., Maxted, W.R. "A comparative study of bacterial cell wall, protoplast membrane and L-form envelope of Streptococcus pyogenes". Ant. van Leeuwenhoek. 31/423-422 (1965).
- 58) Jawetz, E.
REVIEW OF MEDICAL MICROBIOLOGY
13th Edition
Lange Medical Publications.
Los Altos California (1969).
- 59) Jawetz, E., Melnick, L.J., Adelberg, A.E.
MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDIA
9a. Edición
Editorial El Manual Moderno, S.A.
México (1981).
- 60) Joklik, R.W., Smith, T.D.
MICROBIOLOGY
16th Edition
Appleton-century-crofts
New York (1976).
- 61) Kagan, E.H. "Staphylococcal L-forms ecologic perspectives". Ann. N.Y. Acad. Sci. 123/81-93 (1965).
- 62) Kagan, G.Y., Mikhailova, V.S. "Isolation of pleuro-pneumonia like organisms, L-forms and heteromorphous growth of bacteria from the cerebrospinal fluid of patients with septic meningitis". J. Hyg. Epidem. 9/310-313 (1965).
- 63) Kalmanson, C., Guze, L. "Role of protoplasts in pathogenesis of pyelonephritis". J.A.M.A. 190/8-11 (1964).
- 64) Kant, R.S., Carida, L.E. "Large bodies of Rhizoglyphus and L-form organisms". J. Bacteriol. 93/1/1137-1142 (1967).
- 65) Kaplan, M.H., Meyerson, M. "An immunological cross-reaction between group A streptococcal cell and human tissue". Lancet. 1/70.-712 (1952).

- 66) King, J.R., Gooder, H. "Reversion to the Streptococcal -- state of enterococcal protoplasts spheroplasts and L- -- forms". J. Bacteriol. 103/692-696 (1970).
- 67) Kliengerger-Nobel, E. "Pleuro-pneumonic like organism - (PPLO) Mycoplasmataceae". Academic. Press. N.Y. (1962).
- 68) Koneman, W.E., Allen, D.S., Dowell, R.K., Sommers, M.H.
DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO
4a. Edición
Editorial Panamericana
México (1973)
- 69) Lamanna, C., Mallette, F.M., Zimmerman, N.L.
BASIC BACTERIOLOGY
4a. Edition
The Williams & Wilins Co.
Baltimore (1973).
- 70) Landman, O.E., Guze, L.B.
MICROBIAL PROTOPLAST, SPHEROPLAST AND L-FORMS.
Protoplast, spheroplasts and L-forms viewed as a genetic system.
Williams and Wilkins Co.
Baltimore (1968).
- 71) Landman, O.E., Forman, A. "Gelatin induced reversion of - protoplasts of Bacillus subtilis to the bacillary form: Biosynthesis of macromolecules and wall during successive steps". J. Bacteriol. 99/576-589 (1969).
- 72) Lederberg, J. "Bacterial protoplast induced by penicillin". Proc. Nat. Acad. Sci. 42/574-591 (1967).
- 73) Lee, G.E. Ford, K.D.
LO ESSENCIAL DE LA INMUNOLOGIA
Editorial El Manual Moderno, S.A.
México (1973).
- 74) Liebermeister, K. "Morphology of the PPLO and L-forms of - Proteus". Ann. N.Y. Acad. Sci. 79/326-343 (1960).
- 75) Lynch, J.M., Raphael, S.S., Mellor, D.L., Sparc, D.P., - Inwood, H.J.
METODOS DE LABORATORIO
4a. Edición
Editorial Interamericana
México (1979).

- 76) Martin, H.H. "Bacterial protoplasts". J. theor. Biol. 5/1/34-39 (1963).
- 77) Martin, H.H., Schilf, W., Schiefer, G.H. "Differentiation of Mycoplasmales from bacterial protoplast L-forms by - assay for penicillin binding proteins". Arch. Microbiol. 127/297-299 (1980).
- 78) Mattman, L.H. "L-variation in mycobacteria". Amer. Resp. Dis. Rev. 82/202-204 (1960).
- 79) Mattman, L.H., Karris, G.L. "L and transitional forms in meningitis". Bact. Proc. 66/49-51 (1968).
- 80) Mattman, L.H., Mattman, P.E. "L-forms of Streptococcus faecalis in septicemia". Arch. Int. Med. 115/315-321 (1965).
- 81) McGee, Z.A., Wittler, R.C., Goode, H., Charache, P. - - "Well-defective microbial variant: terminology and experimental design". J. Infect. Dis. 123/4/433-438 (1971).
- 82) Mc. Gee, Z.A., Wittler, R.C.
MYCOPLASMALES AND THE L-PHASE OF BACTERIAL.
The role of L-phase and other wall defective microbial -- variants in disease.
North-Holland Publishing Co.
Amsterdam (1969).
- 83) Mc.Gee, Z.A., Ratner, H.R., Bryant, R. "An antibody complement system in human serum lethal to L-phase variants of bacteria". J. Infect. Dis. 125/231-239 (1972).
- 84) Mc Kay, K.A., Abelseth, M.K., Vandereumel, A.A. "Production of an enzootic-like pneumonia in pigs with protoplasts of Haemophilus parainfluenzae". Nature. 2/2/ - 359-360 (1966).
- 85) Mc. Quillen, K. "Bacterial protoplasts". Acad. Press. - N.Y. 1/249-359 (1960).
- 86) Medill-Brown, M., Hutchinson W.C., Cocklin, E. "The L- - forms of Proteus mirabilis". Ann. N.Y. Acad. Sci. 79/ 374-379 (1960).
- 87) Morrison, T.H., Weibull, C. "The occurrence of cell wall constituents in stable Proteus L-forms". Acta Path. Microbiol. Scand. 55/475-482 (1962).

- 88) Mortimer, E.A. "Production of L-forms of Group A Streptococci in mice". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119/159-163 - (1965).
- 89) Murray, R.G.E., Guze, L.B.
MICROBIAL PROTOPLASTS SPHEROPLAST AND L FORMS.
Bacterial cell wall, Anatomy in relation to the formation of spheroplasts and protoplasts.
Williams and Wilkins Co.
Baltimore (1967).
- 90) Muñoz, O., González, S., Echavarría, H., Hernández, M. -
"Bacterias atípicas en meningoencefalitis purulenta". -
Bol. Med. Hosp. Inf. Mex. 116/2/73-76 (1980).
- 91) Nativelle, R., Deparis, M. "Formes evolutive des bactéries dans les hémocultures". Presse Med. 68/570-574 - - (1960).
- 92) Panos, C.
MICROBIAL PROTOPLASTS, SPHEROPLASTS AND L FORMS.
Comparative biochemistry of membranes from streptococcus pyogenes and derived state L-forms.
Williams and Wilkins Co.
Baltimore (1967).
- 93) Panos, C. et al. "Streptococcal L-forms. III. Effect of sonic treatment on viability". J. Bacteriol. 80/336-341 (1960).
- 94) Pawlowski, K.M., Bloudorf, J.W., Kimmelsfiel, P. "Chronic pyelonephritis morfologic and bacteriologic study". N. Engl. J. Med. 268/965-969 (1963).
- 95) Perkins, H.R. "Specificity of combination between mucopeptide precursors and vancomycin or ristocetin". J. -- Biochem. 111/195-205 (1969).
- 96) Razin, S., Argaman, N. "Lysis of Mycoplasma, bacterial - protoplasts, spheroplasts and L-forms by various agents". J. Gen. Microbiol. 30/155-172 (1963).
- 97) Rosener, R. "Isolation of Candida protoplast form a case of Candida endocarditis". J. Bacteriol. 91/1320-1325 - - (1966).

- 98) Saulsbury, T.F., Winkelstein, A.J. "Activation of the alternative complement pathway by L-phase variants of Gram positive bacteria". *Inf. Immun.* 23/3/711-716 (1979).
- 99) Shapiro, A.P., Braude, A.I., Sieminski, J. "Hematogenous pyelonephritis in rats: Relationship of bacterial species to the pathogenesis and sequelae of chronic pyelonephritis". *J. Clin. Invest.* 38/1228-1240 (1959).
- 100) Sharp, J.T. "L-colonies from hemolytic Streptococci: New technic in the study of L-forms of bacteria". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 87/94-99 (1954).
- 101) Siewert, G., Strominger, J.L. "Bacitracin: an inhibitor of the dephosphorylation of lipid pyrophosphate, an intermediate in the biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls". *Proc. Nat. Acad. Sci.* 57/767-773 (1967).
- 102) Snyderman, R., Gewurz, H., Mergenhagen, S.E. "Interactions of the complement system with endotoxic lipopolysaccharide: generation of a factor chemotactic for polymorphonuclear leukocytes". *J. Exp. Med.* 128/259-275 -- (1968).
- 103) Tietz Norbert W.
QUIMICA CLINICA MODERNA
Editorial Interamericana
México (1981).
- 104) Tipper, D.I., Strominger, J.L. "Inhibition of cross-linking by penicillins and cephalosporins: Studies in Staphylococcus aureus in vivo". *J. Biol. Chem.* 243/3169-3179 (1968).
- 105) Tulasne, R., et al. "Etude comparative AU microscope, -- électronique d' un Proteus et des formes L des types A -- et B correspondants". *Ann. Inst. Pasteur.* 102/292-298 -- (1962).
- 106) Turk, C.D., Porter, A.I.
A SHORT TEXTBOOK OF MEDICAL MICROBIOLOGY
4th Edition
Hodder and Stoughton
London (1978).

- 107) Ward, P.A., Lepow, I.H., Newman, L.J. "Bacterial factors chemotactic for polymorphonuclear leukocytes". Amer. J. - Path. 52/725-736 (1958).
- 108) Weibull, C., Bickel, W.D., Haskins, W.T., Milner, K.C., Ribi, E. "Chemical, biological, and structural properties of stable proteus 1 forms and their parent bacteria". J. Bacteriol. 79/638-649 (1960).
- 109) Wistreich, G.A., Lechtman, M.D.
MICROBIOLOGY
3rd. Edition
Collier Macmillan Publishers
London (1980).
- 110) Wittler, R.G., Malizia, W.F., Kramer, J.D., Tuckett, J.D., Pritchard, H.N., Baker, K.J. "Isolation of Corynebacterium and its transitional forms from a case of subacute bacterial endocarditis treated with antibiotics". J. Gen Microbiol. 23/315-333 (1960).
- 111) Zabriskie, J.B., Freimer, E.H. "Immunological relationship between the group A Streptococcus and mammalian muscle. J. Exp. Med. 124/661-667 (1966).