

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**



**EXAMEN PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA**

**ESTUDIO DE LAS PRINCIPALES INFECCIONES  
CAUSADAS POR DIFERENTES ESPECIES DE  
MYCOPLASMA EN EL HOMBRE Y LOS ANIMALES  
DOMESTICOS Y DE EXPERIMENTACION**

**TRABAJO MONOGRAFICO**

**MARIA ISABEL SANCHEZ MALDONADO**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**MEXICO, D. F.**

**1982**



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 esta 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.

## INDICE

	PAG.
INTRODUCCION ..	1
<b>CAPITULO PRIMERO</b>	
<b>GENERALIDADES.</b>	
1) Antecedentes ..	3
2) Clasificación ..	7
3) Propiedades Biológicas ..	9
A) Morfología y Tinción ..	9
B) Requerimientos Nutricionales ..	14
C) Comportamiento ..	17
D) Reproducción ..	20
E) Resistencia a Agentes Ambientales ..	24
F) Relación a Formas L ..	24
4) Antígenos e Inmunidad ..	28
5) Especies encontradas en el hombre y su acción patógena ..	32
<b>CAPITULO SEGUNDO</b>	
<b>PRINCIPALES ENFERMEDADES.</b>	
1) Enfermedades en el Hombre ..	40
A) Padecimientos del Tracto Respiratorio ..	44
B) Otros Padecimientos ..	48
C) Complicaciones ..	61
a) Auditivas ..	62
b) Neurológicas ..	64
c) Cutáneas ..	66
d) Digestivas ..	68
e) Hematológicas ..	69
f) Articulares ..	70
g) Otras Complicaciones ..	71
D) Epidemiología ..	72
2) Principales Enfermedades en Animales ..	78

**CAPITULO TERCERO**

**DIAGNOSTICO DE LABORATORIO**

1) Bacteriológico .....	93
A) Toma de la Muestra .....	94
B) Medios de Cultivo Empleados .....	96
a) De Tejido Modificado .....	96
b) Para el Aislamiento e Identificación .....	97
c) Observación de las Colonias .....	99
d) Transferencia de Cultivos .....	101
2) Inmunológico.....	101
A) Serología .....	101
B) Inmunofluorescencia .....	104
C) Complemento .....	106
D) Hemolisinas .....	108
E) Hemaglutinación .....	109
F) Inhibición del Crecimiento .....	110

**CAPITULO CUARTO**

<b>PROFILAXIS Y TRATAMIENTO .....</b>	<b>112</b>
---------------------------------------	------------

<b>DISCUSION .....</b>	<b>115</b>
------------------------	------------

<b>ANEKOS .....</b>	<b>117</b>
---------------------	------------

<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>126</b>
---------------------------	------------

## INTRODUCCION

Debido a que la neumonía es uno de los grandes males que aquejan a la humanidad, se determinó elaborar este tema con el objeto de incitar a que en un futuro no lejano, se de la debida importancia a la investigación sobre M. pneumoniae dentro de los análisis de rutina de exudados faríngeos que se practican en el laboratorio de Análisis Clínicos Bacteriológicos como causa de la enfermedad, así mismo que se realice la debida investigación de las diferentes especies de Mycoplasma que son causantes de diversas enfermedades en el hombre y en animales domésticos y de experimentación dentro de las respectivas áreas para evitar posteriores endemias o epidemias, ya que en la actualidad, en los laboratorios clínicos de las diversas áreas médicas, no se les da la importancia que realmente tienen.

Las estadísticas revelan que la neumonía causada por M. pneumoniae y otras especies de Mycoplasma causa un alto índice de infección, no sólomente en las áreas urbanas, sino también en las zonas rurales.

Si en los laboratorios de los centros asistenciales se le diera al estudio de Mycoplasma, la importancia que realmente revisten, se podría combatir adecuadamente esta enfermedad que causa estragos sobre todo en la población de mediana edad.

Cuando se tomen en cuenta en los hospitales o centros asistenciales y médicos, los estudios de las diferentes especies de Mycoplasma, el índice de las enfermedades producidas -- por éstos, tanto en humanos como en animales domésticos y de -- experimentación, bajará en forma considerable.

## CAPITULO PRIMERO

### I.- GENERALIDADES.

#### 1).- ANTECEDENTES.

En Europa durante el siglo XVIII, apareció una enfermedad muy contagiosa en el ganado que causó enormes pérdidas - (24); posteriormente en 1850 se reconoció por primera vez en animales una pleuresía y consolidación pulmonar que como se caracterizaba por producir gran cantidad de exudado seroso en -- los pulmones y las cavidades pleurales, se denominó pleuropneu monía.

Años más tarde, se observó que la inyección de una - gota de este exudado seroso en la piel de los animales sanos, - causaba una lesiones edematosas que se difundían rápidamente, - a pesar de no haberse bacterias en el exudado.

En 1889, pudo cultivarse el agente causal en medios- enriquecidos con sangre completa y suero. Las colonias desarro lladas eran muy pequeñas y difíciles de observar y los organis mos que componían las mismas, eran tan pequeñas que podían pa sar fácilmente a través de filtros, oscilaban entre diámetros- de 125 a 150  $\mu$  y eran extremadamente pleomórficos y difíciles de tefir.

En los años siguientes, cierto número de microorga--

nismos con morfología y propiedades de cultivo similares se --  
aislaron de gallinas que presentaban infección en vías respira-  
torias otros, a partir de las mucosas del hombre y otros más, -  
a partir del suelo, aguas residuales y estiércol.

Estos microorganismos no sólo se asocian con enferme-  
dades en el hombre y otras especies, sino que también se en---  
cuentran en mucosas normales.

A finales de la década de 1930 y principios de la de  
1940, se describió una forma clínica de enfermedad respirato--  
ria, especialmente frecuente entre los individuos que vivían -  
en instituciones militares, prisiones y escuelas, que se carac-  
terizaba por fiebre, tos ( a menudo intensa ), cefalea, postra-  
ción y que no respondía al tratamiento con sulfamidas o penici-  
lina.

Dingle y Finland (54), en 1942, fueron los primeros-  
autores que propusieron el término de neumonía atípica prima--  
ria para un grupo de neumonías diferentes a la neumonía lobar-  
causada por Streptococcus pneumoniae y que poseían unas caracte-  
rísticas clínicas y radiológicas que lo apartaban de la pneumo-  
nía bacteriana habitual.

Después de muchos intentos para aclarar la enferme--  
dad, Eaton, Meiklejohn y Van Herrick en 1944 (51), lograron a -  
partir de un enfermo, el aislamiento de un agente filtrable, -

que podía mantenerse a través de pases en embriones de pollo - sin causar lesiones demostrables ni neumonía, cuando se inoculaba intranasalmente en hamsters y ratas.

En 1953 se descubrió la presencia de crioaglutininas en el suero de muchos de los enfermos con este tipo de neumonía (19).

La poca virulencia para los animales y la leve capacidad citopatogénica del agente, dificultaron la confirmación del hallazgo, pero en 1957 Liu lo visualizó por medio de la técnica de anticuerpos fluorescentes indirectos (51), practicada al suero de enfermos convalecientes, utilizando como antígeno microorganismos cultivados en embriones de pollo.

Este hallazgo hizo posible el reconocimiento de la infección en los embriones de pollo, que condujo a su vez al desarrollo de métodos cuantitativos para el estudio del organismo y sus anticuerpos, incluyendo el de los anticuerpos neutralizantes en el suero de los convalecientes.

En ocasiones, el agente que crece en los cultivos de tejido como son los bronquios de embriones de pollo inoculados puede identificarse tificándolo por el método de Giemsa.

Además, se demostró que la infección respondía al tratamiento con tetraciclinas, tanto en el hombre como en los embriones de pollo y en las ratas; posteriormente en los anima

les lo hacía al tratamiento con sales de oro.

Estas observaciones eran incompatibles con la aceptación de una etiología viral de la enfermedad y fueron confirmadas en 1962 cuando Chanock y sus cols. (22) consiguieron cultivar el agente en un medio sólido sin células, que contenía suero de caballo y extracto de levadura, dejando ya definitivamente de considerarse como un virus y quedando encuadrado dentro de la categoría de los gérmenes PPLO (Pleuropneumonia Like Organism).

Las diminutas colonias poseían una superficie granular semejante a una mora y se teñían específicamente al unirse con los anticuerpos conjugados con fluoresceína provenientes del suero de un enfermo convaleciente de neumonía atípica.

Con sueros adecuadamente absorbidos se demostró que los anticuerpos específicos que daban lugar a la tinción eran diferentes de las crioaglutininas y de los anticuerpos que reaccionaban con el Streptococcus MG.

El organismo cultivado, denominado M. pneumoniae, difiere antigénicamente de otras variedades de Mycoplasma humanas conocidas: crecen más lentamente que muchas de éstas y, a diferencia de la mayor parte de las especies de Mycoplasma fermentan la glucosa; además, se observó que producía una hemolisina beta para los eritrocitos de cobayo, en contraste con la hemolisina de tipo alfa producida por otras especies humanas.

Esta propiedad estableció las bases para un método - de identificación y recuento en placa de M. pneumoniae, por la zona de hemólisis que puede observarse fácilmente a simple vista.

Al identificarse el agente, etiológico, se ha avanzado en el conocimiento de los mejores antibióticos para su tratamiento y existe la posibilidad de desarrollar una vacuna específica contra M. pneumoniae.

## 2) CLASIFICACION.

Desde el punto de vista de la clasificación microbiológica de Mycoplasma, puede considerarse dentro de la clase de los Mollicutes, generalmente requieren colesterol y proteínas naturales para su desarrollo, pertenecen al Orden X Micoplasmales, con la familia Mycoplasmataceae y Acholeplasmataceae según necesiten o no de colesterol para crecer.

La familia Mycoplasmataceae posee un sólo género, Mycoplasma, del cual actualmente se conocen 37 especies, algunas de ellas se ha demostrado que tienen poder patógeno para el -- hombre y otras son saprofitas.

Las 37 especies que se conocen del género Mycoplasma son las siguientes:

1.- M. mycoides

2.- M. edwardii

1b.- M. mycoides sub-capri

3.- M. cynos

- |                              |                                |
|------------------------------|--------------------------------|
| 4.- <u>M. Bovirhinis</u>     | 20b.- <u>M. orale tipo 3</u>   |
| 5.- <u>M. dispar</u>         | 21.- <u>M. hypopneumoniae</u>  |
| 6.- <u>M. ovipneumoniae</u>  | 22.- <u>M. flocculare</u>      |
| 7.- <u>M. conjunctivae</u>   | 23.- <u>M. pneumoniae</u>      |
| 8 - <u>M. callisepticum</u>  | 24 - <u>M. bovisgenitalium</u> |
| 9.- <u>M. anlis</u>          | 25.- <u>M. agalactiae</u>      |
| 10.- <u>M. synoviae</u>      | 26.- <u>M. alkalencens</u>     |
| 11.- <u>M. neurolyticum</u>  | 27.- <u>M. callinarum</u>      |
| 12.- <u>M. pulmonis</u>      | 28.- <u>M. iners</u>           |
| 13.- <u>M. felis</u>         | 29.- <u>M. malleacridis</u>    |
| 14.- <u>M. feliminutum</u>   | 30.- <u>M. arthritidis</u>     |
| 15.- <u>M. canis</u>         | 31.- <u>M. gatense</u>         |
| 16.- <u>M. maculosum</u>     | 32.- <u>M. hyodysenteriae</u>  |
| 17.- <u>M. spumans</u>       | 33.- <u>M. salivarium</u>      |
| 18.- <u>M. hyosynoviae</u>   | 34.- <u>M. hominis</u>         |
| 19.- <u>M. arginini</u>      | 35.- <u>M. primateum</u>       |
| 20.- <u>M. orale tipo 1</u>  | 36.- <u>M. fermentans</u>      |
| 20a.- <u>M. orale tipo 2</u> | 37.- <u>M. laidlawii</u>       |

En época reciente se han estudiado intensamente estos microorganismos.

De estos pequeños organismos miembros del género Mycoplasma se conoce, que a diferencia de las bacterias, carecen de paredes rígidas, y a diferencia de los virus, son capaces -

de reproducirse en medios sin células.

Las características de las numerosas especies aisladas de animales y del hombre han sido revisadas en años recientes, y un resumen modificado de Hayflick sobre las mismas, es como sigue (51):

- Tamaño pequeño (125 - 250  $\mu$ )
- Capacidad para replicarse en un medio libre de células.
- Carecer de pared celular rígida, pleomórficas, con triple capa limitando la membrana (75 a 100  $\text{A}^\circ$  de ancho).
- Requerir de colesterol y proteína natural para su crecimiento (excepto M. laidlawii que es saprofita), con producción de pequeñas colonias (10 a 600 u) en agar, frecuentemente con un centro embebido y una superficie de crecimiento circundante.
- Haber inhibición de crecimiento por acción de anticuerpos específicos y sensibilidad a ciertos antibióticos.
- Carecer de información o derivación detectable de cualquier bacteria.

#### PROPIEDADES BIOLÓGICAS.

##### A) MORFOLOGÍA Y TINCIÓN.

Las características más sobresalientes de estos microorganismos es su pleomorfismo. Probablemente haya pocos o ningún microorganismo tan pleomórfico como éste.

Una de las formas como se describen es la siguiente -

(14):

Son cuerpos pequeños, esféricos, estructuras filamentosas que algunas veces parecen ser fragmentaciones dentro de las unidades mínimas reproductivas.

En preparaciones hechas por impresión de colonias, se pueden ver gránulos de varios tamaños, filamentos, como se mencionó antes, que pueden ser ramificados y contener protoplasma circular, estructuras discoides o en globo, formas de estrellas, en mazo o en anillo, y estructuras ameboides. Los filamentos son más numerosos en los cultivos recientemente aislados y tienden a desaparecer en cultivos antiguos.

El pleomorfismo intenso se debe, en parte, a la fragilidad de los microorganismos o bien es consecuencia de la forma de reproducción diferente de la fisión binaria; es decir el desarrollo de cuerpos redondeados que se transforman en nodulares y los segmentos en células hijas.

Las estructuras viables varían ampliamente de tamaño e incluyen elementos ultramicroscópicos que son filtrables.

Se han descrito experimentos (27) con filtración a través de membranas, en las cuales la concentración de microorganismos en una emulsión se redujo de  $10^8$  a  $10^5$  por paso a través de una membrana de aproximadamente 0.8 micras. Esta proporción disminuye progresivamente con membranas de poros de tamaño decreciente, pero la retención no fué completa hasta que se

empleó la membrana de 0.33 micras.

Basándose en estas observaciones, se estimó que el diámetro de los elementos viables menores, era de 165 a 247 milimicras. Estimaciones semejantes varían algo para otras cepas por ejemplo el agente de la pleuropneumonía tiene de 125 a 175 milimicras.

Estudios de microscopía electrónica revelan que están rodeados por una membrana limitante de 75 a 100 Å de espesor, que consta de dos placas densas separadas por una película de material de baja densidad, que es semejante en las microfotografías electrónicas, a las membranas citoplásmicas de las células animales.

En el interior de la célula pueden observarse ribosomas y "filamentos nucleares" y en algunas cepas, también puede comprobarse la existencia de material amorfo en la superficie externa de la membrana, que sugiere la existencia de una cápsula o pared rudimentaria (24).

La morfología colonial de Mycoplasma se estudia con procedimientos especiales de preparación y tinción.

Sin embargo para muchos propósitos, las colonias pueden ser adecuadamente visualizadas sobre placas de agar sin recurrir a la tinción, con objetivo de bajo poder (x 30 x 100) e iluminación oblicua ligera, como colonias aparentemente granulares.

La porción baja del centro de la colonia está sumida en el agar y alrededor del centro puede aparecer un halo de -- crecimiento sobre la superficie del agar dando la apariencia - de un huevo frito, el halo puede aparecer liso, espumoso o grnular. M. pneumoniae y M. fermentans usualmente no tienen el - halo en el aislamiento inicial. Este aspecto de huevo frito se debe a que la zona central presenta crecimiento hacia la pro-- fundidad del agar; sin embargo, muchas colonias pierden la forma periférica clara de crecimiento superficial y presentan so-- lo el centro obscuro. Las colonias de la mayor parte de las cepas humanas cultivadas en condiciones aerobias en agar sangre, están rodeadas por zonas de hemólisis alfa o beta. Cuando cre-- cen en medios líquidos, producen poca turbidez.

No son demostrables coloreando con anilínicos suaves pero se tifen mediante ciertos métodos policrómicos, como en - el Giemsa y el colorante para Rickettsias de Castañeda.

Las películas gruesas, preparadas de sedimentos de - cultivos centrifugados, son Gram negativas.

La característica de algunas cepas de crecer en colonias pequeñas, apareciendo como hojuelas pegadas a los lados - del tubo tienen cierto valor diferencial. En todo caso, los -- signos visibles de crecimiento son muy ligeros y casi todos -- los investigadores de estos microorganismos han necesitado te-- ner preparado un tubo de medio no inoculado para comparación.-

Generalmente las colonias sobre superficie de agar no son demostrables hasta después de dos o tres días de incubación.

Se observan más fácilmente en preparaciones coloreadas de agar. Se corta un cuadrado de agar de una superficie -- sospechosa y se coloca en una laminilla. Se coloca un cubre---objetos sobre el cual se ha secado una solución alcohólica de azul de metileno y azur, llenando con parafina fundida el espacio entre la laminilla y el cubreobjetos.

Si se incuban por tiempo muy prolongado los microorganismos, en medios enriquecidos con altas concentraciones de suero durante el aislamiento de Mycoplasma, estas incubaciones prolongadas pueden dar lugar a la formación de artefactos de agar que una persona sin experiencia puede confundir fácilmente con colonias de Mycoplasma.

Estos artefactos constituidos por jabones de calcio y magnesio y formaciones cristalinas variadas, pueden servir como un nido para la formación rápida de pseudocolonias.

Posiblemente, las pseudocolonias que han sido observadas en agar suero no sembrado son de naturaleza semejante, - los observadores experimentados las diferencian fácilmente de las colonias verdaderas.

El uso de colorantes y de microscopios de alto poder, son necesarios para determinar la existencia de colonias de Mycoplasma presentes, además de que ayuda a evitar confusiones -

con las formaciones del agar.

Los microorganismos, formaciones pleomorfas Gram negativas, carecen de movilidad y no forman esporas y se pueden observar en las preparaciones húmedas sobre fondo obscuro (74).

#### B) REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES.

*Mycoplasma* requiere para su crecimiento de medios -- ricos constituidos por suero o líquido de ascitis en cantidades relativamente grandes.

Morton y colaboradores (14) han estudiado sus requerimientos de desarrollo, especialmente en el primer aislamiento, han demostrado que estos microorganismos son cultivables -- con seguridad en medios de caldo de corazón de res a pH 7.8 -- conteniendo Bacto peptona ogeptona bacteriológica de Parke-Davis y enriquecidos con un factor termoestable presente en el líquido de ascitis y en el suero.

El medio base más utilizado consta de 10 g de peptona, infusión preparada a partir de 500 g de corazón de buey, - 5 g de cloruro sódico y 14 g de agar por litro. Cada litro de este medio de base se suplementa habitualmente con 200 cm<sup>3</sup> de suero de caballo y 100 cm<sup>3</sup> de extracto de levadura al 25 %. El pH final se ajusta entre 7.6 y 8.

La mayor parte de las especies de *Mycoplasma* requieren esteroides y proteínas séricas para crecer. Como no se sa-

be que los esteroides sean elementos esenciales para otras especies bacterianas, tiene gran interés este requerimiento por parte de *Mycoplasma*.

Las especies que parasitan al hombre contienen de 10- a 20 % de lípidos totales, 50 a 65 % de los cuales son no saponificables; también han podido detectarse lípidos no saponificables en especies saprofitas que pueden crecer en ausencia de esteroide (p. ej. *M. laidlawii*). Se piensa que una función importante de las proteínas del suero, como factor de crecimiento, - está en relación con el metabolismo lípido, puesto que uno de los componentes del suero de caballo es una alfa 1 lipoproteína que contiene colesterol esterificado y fosfolípido. Cuando se extraen los lípidos del suero de caballo, ni los lípidos ni la fracción carente de ellos, pueden por sí solos mantener el crecimiento, siendo necesarias ambas fracciones. El factor de crecimiento proteico probablemente regula la captación de esteroides necesarios para el crecimiento. El factor de crecimiento especial, existente en el extracto de levadura, requerido por *M. pneumoniae* y *M. orale*, es un elemento dializable; sin embargo no ha podido identificarse todavía.

Mientras que la mayor parte de las especies encontradas en el hombre pueden cultivarse en condiciones aerobias, algunas crecen mejor en atmósferas de nitrógeno con 5 a 10 % de

dióxido de carbono. Muchas cepas de Mycoplasma pueden también crecer en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo y en los cultivos celulares. En los embriones de 12 a 13 días M. pneumoniae produce infecciones inaparentes localizadas en la capa del epitelio bronquial. En los cultivos de células de riñon de mono pueden observarse sus colonias tanto dentro como fuera de las células.

Como se muestra en la columna de 3 de la tabla No. 1 algunas especies de Mycoplasma humanos requieren un extracto acuoso de levadura para su crecimiento óptimo; estos incluyen las especies M. orale, M. pneumoniae y el género T.

El uso de un medio difásico (caldo sobre agar) o bien agitación suave del caldo, frecuentemente mejoran el crecimiento.

La velocidad de crecimiento de Mycoplasma varía con el género, las condiciones de incubación y con la utilización de un medio adecuado como se describió anteriormente; M. pneumoniae tiende a ser el de crecimiento más lento de los Mycoplasma humanos, con colonias detectables por primera vez sobre agar después de aproximadamente una semana de aislamiento inicial.

Las diferencias en las velocidades de crecimiento se hacen menos pronunciadas a medida que los géneros se adaptan a las condiciones del laboratorio.

C) COMPORTAMIENTO.

Varios Mycoplasma de distinto origen pueden crecer - en presencia de azul de metileno y causar su reducción, pero - este colorante es inhibidor del crecimiento de ciertas espe--- cies. Entre los Mycoplasma humanos, M. pneumoniae es único en su capacidad para crecer en presencia de azul de metileno.

La adición de azul de metileno a un medio conteniendo glucosa y rojo de fenol, tal como el medio defásico descrito por Grayson et. al. (51), produce un medio selectivo para - la detección de M. pneumoniae en especímenes que provienen de humanos.

El crecimiento se ve indicado por un cambio de color de morado a amarillo.

Otras dos reacciones que distinguen a M. pneumoniae de otros Mycoplasma humanos son:

- 1.- Su capacidad para reducir 2,3,5, cloro trifeniltetrazolio, mientras se incuba aeróbicamente.
- 2.- La producción de una beta hemólisis en las células rojas - del cerdo de Guinea o de la oveja.

Varios Mycoplasma humanos pueden reducir el tetrazolio durante la incubación anaeróbica, y por tanto, la incubación aeróbica es importante si esta reacción es utilizada como una característica diferencial para M. pneumoniae.

M. laidlawii tipo B, que es un saprofito común del suelo y de los desechos, también puede reducir aeróbicamente el tetrazolio haciendo esta prueba no específica, pero este es un Mycoplasma que no se encuentra ordinariamente en el tracto respiratorio humano.

La beta hemólisis ocurre en un período de 24-48 hrs. -- alrededor de las colonias de M. pneumoniae desarrolladas sobre -- agar y que han sido cubiertas con una pequeña capa de sangre de -- cayo o de oveja.

Una hemólisis tipo alfa más lenta, se efectúa con otros Mycoplasma humanos cuando se utilizan células rojas de humano, de caballo o de conejo.

La hemolisina de M. pneumoniae, parece ser un peroxid-- y requiere un extracto de levadura y una incubación aeróbica para su demostración.

Otros dos fenómenos que ocurren con M. pneumoniae como -- son la hemadsorción y la hemaglutinación acumulativa, sugieren -- una afinidad directa por las membranas de las células rojas ad-- más de la liberación de una hemolisina.

La hemólisis tipo beta también puede ocurrir alrededor -- de Mycoplasma de otras fuentes como M. laidlawii tipo B, y otros -- que contaminan cultivos de tejidos; por lo tanto, el conocimiento de la fuente y la historia de un Mycoplasma dado, es importante -- en la interpretación de la prueba.

La prueba se realiza con base en la característica única de M. pneumoniae, de producir lisis completas de ciertos glóbulos rojos de mamíferos de acuerdo a lo siguiente:

Si las placas que contienen estas colonias se cubren con una suspensión al 3 % de dichos glóbulos, se observa que se producen zonas de hemólisis beta.

Es todavía más notable el fenómeno de hemadsorción, que presenta también M. pneumoniae:

Un cultivo que presente colonias de este tipo, se cubre con una suspensión de glóbulos rojos humanos del grupo 0 - al 0.5 % en solución salina (pueden emplearse otros glóbulos de mamíferos), se espera treinta minutos, luego se quita la suspensión de glóbulos con solución salina y se observan las colonias al microscopio; se ve que se encuentra una capa de glóbulos rojos alrededor de éstas, por hemadsorción directa.

Para el aislamiento primario de estos microorganismos se requieren inóculos bastante abundantes, 0.1 a 0.2 ml. de tejido infectado desmenuzado, cantidades semejantes se requieren para la resiembra en caldo y para cultivos en agar se corta una pequeña sección del medio y se deja caer en medios líquidos o se estría en otra placa.

Un hecho curioso es que su aislamiento primario, se logra más fácilmente que su conservación.

D) REPRODUCCION.

La ausencia de pared rígida se asocia a un tipo de reproducción muy diferente de las bacterias típicas, en las que la división empieza con la formación de un tabique bien definido .

Aunque el mecanismo de división en Mycoplasma no se ha establecido de modo unívoco, las observaciones microscópicas sugieren que el ciclo de cambios morfológicos se sucede como se señala en la ilustración.

El tamaño de las unidades reproductivas menores es difícil medirse a causa de su plasticidad, pero algunas de ellas son capaces de atravesar filtros, como se vió anteriormente, de 125  $\mu$ .

Se piensa que estas pequeñas unidades se forman a partir de células mucho mayores, de las que posteriormente se separa.

De esta forma parece perpetuarse el ciclo. La gran plasticidad de las grandes células, permite adquirir, de un modo especial en medios líquidos, formas sorprendentes, tales como las que se observan en la ilustración de la replicación.

Como la formación de septos es regulada, al parecer por los mesosomas, se ha sugerido que la ausencia de éstos en los Mycoplasma, es la causa de su ciclo reproductivo particular.

Diagramas de la replicación de los Mycoplasma en medios líquidos ( izquierda ) y sólidos ( derecha ).

1) unidad reproductiva mínima; 2) célula micoplásmica-pleomorfica; 3) concentraciones de citoplasma opaco en los márgenes de las células; 4) aparición de los gránulos reproductores en el interior de las células; 5) nueva generación de células que emerge de los gránulos.

( De E. Klieneberger-Nobel. PLO Mycoplasmataceae. Academic Press New York, 1962 ).

## CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO DE LAS ESPECIES DE MYCOPLASMAS.

( 24 )

TABLA #1	ANABROBI CO	AE RO BI CO	NECESI DAD DE EXTRAC TO DE LEVA DURA	INDICE	FORMA DE LA COLO- NIA	FERMEN TACION DE LA GLUCO SA	HEMOLI SIS DE LOS ERI TROCITOS DE COBA YO	HEM AD SOR CION	REDUCCION AEROBICA DEL TE TRAZOLIO
ESPECIES									
<u>M. hominis</u> tipo 1	+	+	0	RAPIDO	huevo frito con pe riferia espumo sa	0	LENTO	0	0
<u>M. hominis</u> tipo 2	+	+	0	RAPIDO	"	0	LENTO	0	0
<u>M. saliva rium</u>	+	0	0	RAPIDO	"	0	LENTO	0	0
<u>M. orale</u>	+	+	+	MODERA DO	huevo frito con pe riferia peque ña	0	LENTO	0	0
<u>M. ferren tans</u>	+	+	0	MODERA DO	granu lar a menudo sin pe riferia	+	LENTO	0	0
<u>M. pncuso side</u>	+	+	+	LENTO	granu lar nor malmen te sin perife ria	+	RAPIDO	+	+

(51)

Especie	pH optimo para el Crecimiento	Crecimiento Azul de Metileno (0.02% en caldo 0.002% en Agar )	Hemolisis de Células Rojas Sanguíneas de Cerdo de Guinea
<u>M. Fermentans</u>	7.0-8.0	0	Alfa
<u>M. hominis</u> tipo I	6.0-7.0	0	Alfa
<u>M. orale</u> tipo I y 2	6.0-7.0	0	Alfa
<u>M. pneumoniae</u>	7.0-8.0	+	beta 24-48 Hrs.
<u>M. salivarium</u>	5.5-6.5	0	Alfa
Genero "T"	5.5-6.5	?	?

### E) RESISTENCIA A AGENTES AMBIENTALES.

El pH óptimo para el crecimiento de los distintos -- Mycoplasma de origen humano se indica en la tabla No. 1 anexa.

En algunos casos, estos microorganismos toleran una variación de pH relativamente amplia, pero otros mueren en pH de 7.0 o menos, y requieren pH de 7.8 a 8.0 para crecer. Las variedades saprófitas pueden crecer a 22°C, con temperatura óptima de 30°C, pero las parasitarias requieren 37°C.

El crecimiento de algunos géneros no fermentadores -- se acompaña de un incremento en la alcalinidad, ya sea debido a la utilización de aminoácidos que liberan amoníaco, o en el caso del género T a través de la descomposición de la urea. Un medio ligeramente ácido favorece el crecimiento de los géneros no fermentadores.

La resistencia al calor de algunas cepas es semejante a la de la mayor parte de las bacterias; otras parecen más susceptibles y mueren a 45°C en 15 min. Los cultivos se conservan mejor a temperatura de incubadora en medios sin azúcar; -- cuando se sella con petrolato, el microorganismo puede conservarse viable durante un mes o más.

### F) RELACION A FORMAS L.

En las placas de cultivo pueden crecer colonias similares a las de Mycoplasma, que corresponden a otros tipos dife

rentes de bacterias, entre las que se incluyen enterobacterias coccos piógenos, bacilos Gram positivos, bacteroides y estrepto bacilos. Su formación se debe a la existencia en el medio de - altas concentraciones de sales y de diversos agentes tóxicos - como la penicilina.

Los organismos existentes en tales colonias, que son pleomórficos y se tiñen débilmente con los colorantes, se han denominado Formas L, al ser aisladas en el instituto Lister de Londres por Klienerberger en 1935, a partir de cultivos de --- Streptobacillus moniliformis; tras las resiembras, las Formas-L continúan creciendo lentamente como organismos de pared defi ciente.

Pueden considerarse como derivadas, más que como con taminantes de los cultivos bacterianos, debido a que la mayor parte de ellas podrá revertir a su forma bacteriana original.

También pueden demostrarse relaciones antigénicas de las membranas celulares. Algunas capas son excepcionalmente es tables y no revierten a su forma original, siendo indistingui bles de los Mycoplasma, excepto por su origen y su especifici dad antigénica (24).

Como son variantes bacterianas que carecen de parte o de toda la pared celular, pueden ser llamados protoplastos o - esferoplastos dependiendo de la presencia o ausencia de restos de pared celular y capacidad o incapacidad para revertir a su-

forma original.

Como las Formas L han perdido su pared celular mucopolisacárida rígida, no se afectan por la penicilina, pudiendo -- por ello, cultivarse selectivamente en medios que contienen este medicamento, pero cuando éste se elimina del medio, algunas capas revierten inmediatamente a su estado bacteriano habitual, mientras que otras siguen creciendo como Formas L. A semejanza de *Mycoplasma saprofitos*, las Formas L no necesitan colesterol para su crecimiento.

Relación con la enfermedad:

Aunque las Formas L fueron cultivadas por primera -- vez por Klieneberger a partir de ratas infectadas por S. moniliformis, son habitualmente producto de manipulaciones de laboratorio, a partir de las cuales de bacterias se someten a crecimiento en condiciones adversas. No se han obtenido cultivos de Formas L a partir de los animales o de hombres afectados por -- enfermedades naturales en ausencia de bacterias que las originan y todas las Formas L de bacterias patógenas inducidas artificialmente, han demostrado carecer de acción patógena (74). -- Sin embargo, sigue presentando gran interés la posibilidad de -- que por lo menos algunas Formas L son potencialmente patógenas en especial denado lugar a infecciones inaparente.

Esta patogenidad es debatida, (51) pero parece que -- estas Formas L pueden servir como un mecanismo por el cual los

organismos persisten en el huésped y causan exacerbaciones de infecciones sintomáticas por reversión a la forma madre.

Las formas L de estreptococo elaboran muchos antígenos extracelulares, entre ellos la proteína M, a pesar de su incapacidad de formar una pared celular normal. En las infecciones de las vías urogenitales han podido cultivarse Formas L derivadas de bacterias tales como coliformes, gonococos y difteroides (96).

El rescate inicial de las variantes bacterianas está encausado por el uso de un medio enriquecido conteniendo suero y teniendo un incremento de osmolaridad y un aumento en la concentración de magnesio, más allá de lo usado normalmente.

Por ejemplo, podría usarse un medio para Mycoplasma (tal como se describe) con 10 % (en agar) ó 20 % (en caldo) de sacarosa y 0.25 % de  $MgSO_4 \cdot 4H_2O$ .

En casos continuos, el organismo variante usualmente se revierte a la forma madre pero puede llegar a ser un estabilizador variante de las Formas L.

La posible relación de las Formas L estreptocócicas con la patogénesis de la fiebre reumática, está siendo estudiada en la actualidad (96).

La mayor parte de los Mycoplasma son más pequeños -- que las Formas L, y contienen menos DNA que el que se encuentra en el núcleo bacteriano normal.

La característica principal que diferencia Formas L de Mycoplasma, es la conocida derivación de las Formas L de un organismo madre y/o la capacidad de las Formas L a revertirse al organismo madre. Aunque hay otras diferencias entre Formas L y Mycoplasma, tales como morfología y requerimientos de colesterol (requerido por Mycoplasma, excepto por M. laidlawii y no por las Formas L).

Un organismo como las características previamente -- descritas es usualmente considerado como un Mycoplasma, si no es conocida otra forma de derivación o si no hay capacidad de revertirse a una bacteria.

#### 4) ANTIGENOS E INMUNIDAD.

Las especies de Mycoplasma humanas señaladas en la - tabla No. 2 pueden diferenciarse por sus antígenos de superficie. Los antígenos específicos se detectan mejor por técnicas de inmunofluorescencia y de inhibición de crecimiento.

En el método de inmunofluorescencia, el suero marcado con fluoresceína reacciona con cortes congelados del tejido infectado o con colonias transferidas desde el agar a un porta objetos. En el método de inhibición del crecimiento, se sitúan discos de papel impregnados de suero en la superficie de placas de agar sembradas uniformemente con organismos, considerándos

se como punto límite de la reacción, la mayor dilución de suero que inhibe el crecimiento alrededor del disco. La inhibición -- del crecimiento es consecuencia de la combinación del anticuerpo con los sitios reactivos específicos de la superficie de la célula, sin que sea necesario complemento para que tenga lugar la reacción. Esta reacción es de gran interés teórico, porque el anticuerpo sólo, no puede inhibir el crecimiento de las bacterias que poseen pared celular.

Mientras que los antígenos detectados por inmunofluorescencia e inhibición del crecimiento son específicos de especie, han podido demostrarse otros antígenos menores de membranas, que presentan reacciones cruzadas entre ellos, por medio de técnicas más sensibles de fijación del complemento (CF) y -- hemaglutinación indirecta (IHA).

(M. hominis tipo 2, es indistinguible antigénicamente de M. arthritidis, especie causante de artritis en las ratas).

Algunos de los antígenos detectados por fijación del complemento pueden extraerse con éter o cloroformo por lo cual se supone que se trata de lípidos. En el método de hemaglutinación indirecta, se utilizan como antígenos, organismos fragmentados con ayuda de ultrasonido para sensibilizar los eritrocitos de carnero crenados.

En ocasiones, se emplean también técnicas de aglutinación y difusión en gel.

INMUNIDAD.

Las infecciones causadas por M. pneumoniae conducen a la formación de tres tipos de anticuerpos como mínimo: anticuerpos frente a los antígenos de superficie del organismo, específicos de especie fácilmente detectables por métodos de inmunofluorescencia; crioaglutininas y aglutininas para el Estreptococo MG. Las pruebas de absorción cruzada muestran que estos tres tipos de anticuerpos son distintos.

Se ha demostrado que los anticuerpos específicos son protectores por su efecto inhibitor del crecimiento in vitro - y por la inmunidad observada en los experimentos anteriormente citados en voluntarios humanos; en general, se detecta en el suero de los enfermos durante la segunda o tercera semana de la enfermedad, pero no se sabe durante cuánto tiempo persiste. (24) Su índice de frecuencia aumenta con la edad. Se han encontrado pocos de recidiva de neumonía micoplásmica. Las crioaglutininas y los anticuerpos frente al Estreptococo MG no aparecen en todos los casos de neumonía causada por M. pneumoniae. La respuesta de crioaglutininas parece estar relacionada con la gravedad de la enfermedad.

Con el organismo causa hemólisis parcial en los eritrocitos humanos, así como la característica hemólisis total - en los eritrocitos de cobayo, se ha señalado que la inducción-

TABLA # 2

RELACIONES ANTIGENICAS DE LAS ESPECIES DE MYCOPLASMAS DEL HOMBRE  
DEMOSTRADA POR PRUEBAS DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA.

ANTISUERO DE CONEJO	<u>M.hominis</u> tipo 1	<u>M.hominis</u> tipo 2	<u>M. saliva-</u> <u>rium</u>	<u>M. orale</u>	<u>M. fermentans</u>	<u>M. pneumo-</u> <u>niae</u>
<u>M. hominis</u> tipo 1	1.280	20	160	160	< 20	< 20
<u>M. hominis</u> tipo 2	40	2.560	160	< 20	< 20	< 20
<u>M. saliva-</u> <u>rium</u>	< 20	40	2.560	40	< 20	< 20
<u>M. orale</u>	160	160	1.280	2.560	< 20	< 20
<u>M. fermentans</u>	< 20	< 20	< 20	< 20	80	< 20
<u>M. pneumo-</u> <u>niae</u>	< 20	< 20	80	< 20	< 20	640

de las crioaglutininas puede ser una reacción autoinmune consecutiva a la hemólisis de los eritrocitos en el huésped.

El estímulo para la respuesta de anticuerpos frente al Estreptococo no está aclarado: estudios sobre la hibridación de DNA han excluido la posibilidad de que M. pneumoniae sea una Forma L de Estreptococo MG, pero es evidente que los dos organismos tienen antígenos comunes.

#### 5) ESPECIES ENCONTRADAS EN EL HOMBRE Y SU ACCION PATOGENA.

Durante los últimos años ha aumentado mucho el interés por Mycoplasma al demostrarse la relación etiológica entre un tipo de estos agentes y la neumonía humana.

Algunas especies o cepas no pueden diferenciarse bien unas de otras, por este motivo han sido definidas por su base inmunológica.

En la tabla 1 se dan algunas de las principales características de las especies más estudiadas del género Mycoplasma encontradas en el hombre: M. pneumoniae, M. orale y M. salivarium, que se aíslan de las vías respiratorias y M. fermentans y M. hominis tipo 2, que se aíslan de las vías genitourinarias. M. hominis tipo 1, ha sido aislado tanto de estas regiones como del ano, sangre y líquido pleural.

Como puede observarse en la tabla 1, M. pneumoniae se diferencia de las demás especies por la lentitud de su cre-

cimiento, su capacidad de producir una hemolisina beta para los hemáties de cobayo, su capacidad de hemadsorber eritrocitos de diversas especies animales a sus colonias superficiales y su capacidad de reducir el tetrazolio en condiciones anaeróbicas.

De las vías urogenitales del hombre, pueden aislarse o tras especies de *Mycoplasma*, tales como las cepas T, de características poco conocidas, llamas así porque dan lugar a pequeñas colonias en los medios sólidos. (15 a 20  $\mu$  de diámetro).

Los *Mycoplasma* patógenos se comportan como parásitos-intracelulares, poseyendo predilección por las células del Sistema Nervioso Central y las mesenquimáticas que recubren las cavidades serosas (pleura, peritoneo, sinovial, etc..).

Las especies patógenas más estudiadas en los animales son las causantes de la pleuropneumonía bovina (*M. mycoides*), - la agalactia de los carneros y las cabras (*M. agalactie*), la poliartritis de las ratas (*M. arthritidis*) y una enfermedad neurológica atóxica en los ratones (*M. neurolyticum*).

La pleuropneumonía del ganado, frecuente aún en muchas partes del mundo, fué erradicada de los Estados Unidos en los primeros años de la década de 1960, y aparentemente no ha vuelto a manifestarse. La agalactia contagiosa de los carneros y las cabras, es más frecuente en las regiones mediterráneas -

(14).

La poliartritis de las ratas causadas por M. arthritidis se caracteriza por lesiones piógenas crónicas, en ocasiones dan lugar a la destrucción de las superficies articulares.

M. Neurolyticum puede aislarse frecuentemente de la orofaringe de los ratones de laboratorio. Sabin demostró que dan lugar a la producción de una neurotoxina soluble, que causa una enfermedad en los ratones que se manifiesta por movimientos rotatorios del cuerpo. Se observó que otras especies aisladas de ratones causaban artritis progresiva. También se han -- aislado Mycoplasma de perros enfermos (pero no hay pruebas que desempeñen un papel en la enfermedad). (45).

Se piensa que las infecciones latentes por Mycoplasma son frecuentes entre animales.

Hasta hace poco no se había demostrado la capacidad patógena de los Mycoplasma hacia el hombre, aunque se había -- cultivado de:

- 1) Líquido articular en caso de fiebre reumática aguda o de artritis reumatoide.
- 2) Pacientes con enfermedad es urogenitales de etiología no -- precisada (uretritis, cistitis, etc...);
- 3) articulaciones y de las lesiones genitales y oculares de pa cientes afectados del síndrome de Reiter (uretritis no gon coccica, conjuntivitis y artritis); no se había establecido u na relación causal entre ellos y estas enfermedades, porque

habían podido aislarse cepas similares, sino es que idénticas, de las vías respiratorias y urogenitales de individuos sanos, y la respuesta de anticuerpos era irregular. Sin embargo, se ha establecido firmemente en la actualidad, tras una serie de estudios, la etiología micoplásmica de una forma de neumonía a típica primaria, considerada durante mucho tiempo como viral.

A) Mycoplasma fermentans relacionado con linfocitos humanos.

M. Fermentans según Gunnel (56) estimuló la síntesis de DNA en los linfocitos de la sangre en 20 sujetos sanos examinados. Sólo uno de ellos tenían anticuerpos fijadores del complemento para M. fermentans.

También se estimularon para sintetizar DNA con M. fermentans linfocitos de 21 a 22 adenoides examinados y de un bazo. El organismo indujo la síntesis de DNA tanto en los linfocitos B como en los linfocitos T de las adenoides y del bazo; y en especial en los linfocitos T sanguíneos.

M. fermentans demostró haber activado los linfocitos adenoides para que tuvieran una respuesta específica de anticuerpos, comprobable con un análisis de placa hemolítica.

Se concluye que M. fermentans puede tener un efecto mitogénico tanto en los linfocitos B como en los T.

Ya se ha dicho con anterioridad que M. pneumoniae, un importante patógeno de las vías respiratorias del hombre, -

puede inducir una secreción de anticuerpos policlonados no específicos in vitro en linfocitos humanos. (58).

M. pneumoniae estimuló la síntesis de DNA en las células B del bazo de un ratón, pero no en los linfocitos B humanos; no obstante estimular las células humanas T, no se ha probado que existan antígenos compartidos entre M. fermentans y M. pneumoniae.

M. fermentans que no se ha comprobado que sea patógeno, se puede aislar del tracto urogenital en alrededor del 1% de los individuos sanos y ocasionalmente se encuentra presente en las articulaciones artríticas. (76)

Los resultados de este estudio muestran que M. fermentans tiene un efecto mitogénico sobre los linfocitos humanos, al estimular tanto a las células B. como a las T de las adenoides y del bazo y, de preferencia, a las células T sanguíneas.

La respuesta a la estimulación de linfocitos sanguíneos por M. fermentans y M. pneumoniae respectivamente, se examinó en 20 adultos sanos no seleccionados. Los linfocitos de todos los 20 donadores respondieron a M. fermentans así como también a M. pneumoniae por una síntesis aumentada de DNA.

Los sueros de 15 a 20 donadores examinados tuvieron anticuerpos fijadores de complemento contra M. pneumoniae pero-

sólo uno, tuvo anticuerpos fijadores de complemento contra M. fermentans. En 9 individuos la respuesta al estímulo para M. fermentans fue de la misma magnitud que la respuesta hacia M. fermentans que a M. pneumoniae. (49)

Entre los donadores, la variación en el grado de la respuesta linfocítica a M. fermentans en parte, podría deberse a las diferencias técnicas en la prueba de estimulación.

Se han realizado también prueba de estimulación con linfocitos de adenoides de 22 niños. Todas las adenoides, salvo una, mostraron una respuesta linfocítica a M. fermentans, mientras que sólo ocho de estas adenoides respondieron a M. pneumoniae. M. fermentans estimuló tanto las preparaciones celulares B enriquecidas, como las T de todas las nueve adenoides examinadas. Aunque es posible que parte de la respuesta a la estimulación de algunas fracciones de células T adenoides, se debió a las células B, ya que las preparaciones adenoides de células T en ocasiones estaban purificadas en forma bastante incompletas, M. pneumoniae estimuló células T en cuatro de 9 adenoides y células B de dos adenoides.

Para este estudio se contó con células B y T disponibles de un bazo humano. (33) M. fermentans estimuló tanto a células B (cultivo de tres días) como a las T del bazo, mientras que M. pneumoniae sólo estimuló a las células T.

El descubrimiento de que M. fermentans estimuló la -- síntesis de DNA en los linfocitos sanguíneos, adenoides o del bazo de todos los individuos examinados, indica que el organismo es mitogénico para los linfocitos humanos.

La inducción por M. pneumoniae a la proliferación de las células T humanas, se ha interpretado como una respuesta - específica antigénica. Tanto M. fermentans como M. pneumoniae estimularon la síntesis de DNA en los linfocitos sanguíneos de todos los donadores examinados, pero sólo un donador tuvo anticuerpos fijadores de complemento para M. fermentans mientras - que la mayoría de los donadores tenían anticuerpos fijadores de complemento para M. pneumoniae, sugiriendo que en alguna -- ocasión anterior habían experimentado una infección por M. pneumoniae. (56)

Hasta ahora se han encontrado cuatro Mycoplasma metabolizadores de glucosa M. fermentans, M. pneumoniae, M. laidlawii y M. pulmonis que son mitogénicos para linfocitos de hombre, ratón o rata. La mitogenicidad podría ser una característica común de muchos Mycoplasma. Sin embargo, los Mycoplasma - metabolizadores de arginina inhiben la estimulación de linfocitos por depresión de la arginina. No se sabe si el potencial - mitogénico de M. fermentans tiene alguna importancia in vivo.

Aunque es concebible que cuando se presenta M. fer--

mentans en una articulación artrítica, podría inducir una acti  
vación mitogénica de linfocitos de líquidos sinoviales.

Estudios preliminares han demostrado que M. fermen--  
tans tiene la capacidad de estimular la síntesis de DNA en lin  
focitos de líquidos sinoviales.

## CAPITULO SEGUNDO

### PRINCIPALES ENFERMEDADES.

#### 1) Enfermedades en el hombre:

La enfermedad humana que se tiene más claramente documentada como causada por un Mycoplasma, es el síndrome conocido como neumonía atípica primaria.

La enfermedad ocurre durante todo el año pero particularmente en el otoño y en el principio del invierno, ataca principalmente a las personas de mediana edad en particular a aquellas que se encuentran en instituciones. El período de incubación es de 1 a 3 semanas y es seguido por fiebre, dolor de cabeza, fatiga, coriza y/o faringitis, tos paroxística con una incomodidad subesternal dolorosa produciendo pequeña cantidad de esputo mucoso que algunas veces contiene ligeras tinciones sanguíneas en forma de hilillos.

Las radiografías normales revelan regiones pequeñas de neumonitis diseminadas sobre la mitad inferior de uno o ambos campos pulmonares cerca del hilio.

Se encuentra una ligera neutrofilia o una cuenta normal de células sanguíneas blancas al igual que una diferencial normal; un cultivo de esputo para bacterias no rinde algún patógeno predominante.

En algunas pacientes de neumonía atípica primaria en la etapa convaleciente, aparecen crioaglutininas. En este síndrome distintivo, existen aglutininas en frío positivas en la neumonía atípica que ha sido más claramente asociada con la infección del agente Eaton ahora conocido como M. pneumoniae.

La enfermedad en su etapa aguda dura aproximadamente una semana, pero la convalecencia puede prolongarse por varias semanas; también M. pneumoniae puede estar presente en las secreciones respiratorias por un período prolongado después de la etapa aguda de la enfermedad, independientemente de que el paciente haya recibido la terapia apropiada.

Se ha probado que el incremento en el título de aglutinas en frío, en únicamente la mitad de los pacientes con neumonía atípica primaria, se debe a M. pneumoniae y existen también elevaciones en el título que han sido ocasionalmente observadas con otro tipo de infecciones y enfermedades.

La diferenciación entre el agente de neumonía Eaton y el causado por adenovirus o por otros agentes, tales como los de la influenza, psitacosis, fiebre Q, etc... no puede ser realizada clínicamente con certeza y es dependiente de un diagnóstico de laboratorio. (20)

Se ha estimado que sólo una de treinta personas susceptibles, han llegado a infectarse con M. pneumoniae presentan

do neumonía (54).

Entre otros signos predominan infecciones respiratorias y bronquitis; pruebas de Coombs positivas y se describen también, altos grados de hemólisis en pacientes infectados con M. pneumoniae encontrándose ocasionalmente pacientes son franca anemia hemolítica, raramente meningitis, síndrome de Stevens Johnson, ptiriasis rosada, eritema nodosum, pericarditis, enfermedades del Sistema Nervioso Central y Periférico y una variedad de otros órganos involucrados que han sido reportados.

(35)

M. hominis tipo 1, un organismo encontrado en tracto orofaríngeo y tracto urogenital, es capaz de aparecer causando faringitis exudativa con adenopatía cervical, aunque no está probado que M. hominis tipo 1 puede causar uretritis y vaginitis; este organismos ha sido aislado de abscesos ováricos y de sangre de pacientes con sepsis puerperal y enfermedad febril después de cirugía ginecológica.

Un filtrado de Mycoplasma tipo T, puede causar uretritis venérea aunque todavía no está probado.

El filtrado de Mycoplasma tipo T, como también de M. salivarium y M. orale tipo 1 y 2, pueden encontrarse en orofarínge normal y M. fermentans puede ser encontrado en el tracto urogenital normal.

Los Mycoplasma han sido tomados de líquidos sinoviales, riñón y médula de cada paciente y se han pasado a través de cultivos de tejidos, antes de obtener el aislamiento en un medio libre de células.

Desde que la presencia de Mycoplasma en cultivos de tejidos es un problema reconocido, el espectro de contaminación puede ser un incremento en el aislamiento verdadero.

Algunos Mycoplasma que se encuentran causando infecciones en cultivos de tejidos, pueden ser aisladas en agar, sólamente después de un cambio en las condiciones de cultivos de tejidos o por el paso dentro de un cultivo de tejido de un tipo de células diferentes.

Una prueba de que Mycoplasma causa actualmente infecciones en el hombre debe aguardar futuras evidencias. Muchos de estos mismos problemas existen con Mycoplasma recuperados de pacientes con leucemia y tumores, tal como resumieron recientemente Leach y Butler (51).

Se han hecho muchos estudios sobre la patología de M. pneumoniae en el hombre, mediante los cuales se ha demostrado que es el más patógeno, siendo además bastante polifacético en su acción.

Aunque la acción patológica de M. pneumoniae se centra principalmente en el aparato respiratorio, posteriormente

se pueden sobreñadir diversas complicaciones.

El mecanismo de acción de M. pneumoniae no se ha -- aclarado del todo, pero parece ser que tiene un alto poder de producción de peróxido de hidrógeno y que éste actúa como una hemolisina, siendo único ejemplo de ello, ya que las demás hemolisinas conocidas producidas por microorganismos, son proteínas. (64)

Sobelavski (21) demostró que M. pneumoniae parecía bloquear mediante un mecanismo no muy conocido, los receptores de ácido neuramínico situados en las membranas de los hematíes y de las células del epitelio bronquio-traqueal.

La destrucción del epitelio traqueobronquial facilitaría el progreso de los microorganismos a través del aparato respiratorio y la gran lisis celular producida por el peróxido de hidrógeno, podría ser la causa última de la lesión producida en el parénquima pulmonar en el caso de la neumonía atípica primaria. Recientemente parece ser que se han descrito algunos virus parásitos de los mismos Mycoplasma, lo cual ha sugerido la teoría de que este parasitismo, por sí mismo, pudiera ser un factor de virulencia, aunque de momento dicha teoría no tiene mayor consecuencia.

#### A).- PADECIMIENTO DEL TRACTO RESPIRATORIO.

En las afecciones respiratorias por M. pneumoniae po

demostramos distinguir dos tipos básicos: las febriles y las afebriles (faringitis, etc...), que aunque existen en proporción valorable, son difíciles de cuantificar estadísticamente.

Dentro de las afecciones febriles podemos distinguir dos tipos:

- afección respiratoria febril sin neumonitis.
- afección respiratoria febril con neumonitis.

En el primer grupo encontramos las faringitis, traqueitis, y bronquitis, siendo *M. pneumoniae* responsable de éstas en una proporción de 7 %.

En el segundo grupo entramos la neumonía atípica primaria como la más frecuente de las infecciones febriles causadas por *M. pneumoniae* (53).

La neumonía atípica primaria es una entidad clínica de la que se admiten diversas etiologías, siendo *M. pneumoniae* el máximo responsable de ella, con estadísticas que oscilan entre 20 % y 50 % de los casos, los cuales dependen de diversos factores epidemiológicos como son:

**Edad** - Se encuentra más frecuentemente en los adolescentes y en adultos jóvenes, habiendo un pico de máxima frecuencia entre los diez y veinte años, poco frecuentes en los menores de 5 años.

**Contactos** - Las epidemias de neumonías por *M. pneumo*

niae se dan generalmente en comunidades cerradas, en que los contactos son muy repetidos, como en colegios, cuarteles, etc. siendo el tiempo de incubación de dos a tres semanas.

Estación - Existe un aumento de casos en otoño y --- principio de invierno.

Clínica - La neumonía causada por M. pneumoniae tiene un comienzo insidioso, como corresponde al cuadro clínico de una neumonía atípica primaria, pero tiene una evolución más prolongada que las de origen viral. El síntoma más prominente es la tos, improductiva, aunque a veces se acompaña de expectoración mucóide. A estas se añaden además cefaleas, malestar general, fiebre y escalofríos. El dolor pleural es raro, aunque pueden coexistir síntomas respiratorios altos en la mitad de los casos, causados por faringitis, rinitis o traqueobronquitis. (59)

En los que se refieren a la anatomía patológica, - en nada se diferencia la neumonía por M. pneumoniae del resto de las neumonías atípicas primarias: el proceso es fundamentalmente intersticial, con una reacción aguda del tejido peribronquial que se extiende desde los vasos sanguíneos y linfáticos - hasta los tabiques interlobulares. La reacción inflamatoria depende de la virulencia relativa del germen y de la cantidad de ellos, variando desde el edema intenso y hemorrágico de los eg

pacios parenquimatosos, con proliferación de polimorfonucleares, proliferación de epitelio respiratorio de bronquios y --- bronquiolos, e incluso alveolos y proliferación de mononucleares.

La neumonía por M. pneumoniae efecta generalmente a los lóbulos inferiores, limitándose a uno sólo en el 50 % de los casos.

George y colaboradores (19) descubrieron el cuadro radiográfico de la neumonía atípica primaria como una condensación segmentaria.

No obstante, se pueden distinguir tres fases en la evolución de la enfermedad: una primera fase de reticulación fina segmentaria, correspondiente a la fase de inflamación intersticial aguda; una segunda fase con imágenes nodulares, de condensación alveolar, y una tercera fase de resolución del proceso, en la que vemos las imágenes reticulares. Son muy escasos los derrames pleurales por M. pneumoniae. Según los mismos autores el tiempo de resolución medio es de 11 días, con desaparición completa de todos los signos radiológicos a los veinticinco días.

Enfermedades humanas en las que se ha sugerido qué especies de Mycoplasma pueden desempeñar un papel etiológico.

Enfermedades	Especies
Faringitis	<u>M. hominis</u>
Septicemia	<u>M. hominis</u>
Peritonitis	<u>M. hominis</u>
Bartholinitis	<u>M. hominis</u>
Infecciones oculares	<u>M. hominis</u>
Abscesos ováricos	<u>M. hominis</u>
Salpingitis	<u>M. hominis</u>
Uretritis no gonocócica	<u>M. hominis</u>
	<u>T-mycoplasma</u>
Aborto séptico	<u>M. hominis</u>
	<u>T-mycoplasma</u>
Sepsis puerperal	<u>M. hominis</u>
	<u>T-mycoplasma</u>
Enf. peridental	<u>M. salivarium</u>
Leuceemia	varios
Artritis reumatoide	varios
Enfermedades autoinmunes	varios
Síndrome de Reiter	varios
Enfermedades de la colágena	no identificados
Lupus eritematoso	no identificados
<b>B) <u>OTROS PADECIMIENTOS.</u></b>	

Las especies de Mycoplasma se encuentran asociados -

con otras diversas enfermedades del hombre, especialmente uretritis no gonocócica en las cuales se ha descubierto repetidamente el tipo M. hominis en gran número. Se han descubierto varias especies en relación a la faringitis exudativa y la amigdalitis; el primer proceso se ha producido en voluntarios humanos con M. hominis tipo 1. Dada la existencia en ratas y ratones de artritis producidas por Mycoplasma, se ha pensado en -- una asociación con la artritis del hombre, pero estos microorganismos sólo se han descubierto ocasionalmente en líquido sinovial artrítico y el proceso no es superado como existe en -- los roedores.

El poder patógeno de Mycoplasma aparte de M. pneumoniae para el hombre, todavía no es seguro, aunque las asociaciones observadas son muy sospechosas. (20)

#### Faringitis exudativa.

Se inoculó a 50 voluntarios varones intranasalmente con la cepa DC-63 de Mycoplasma hominis tipo 1 (una variedad aislada oralmente), y se demostró en 40 de ellos que la enfermedad tenía su causa en este germen.

Se encontró también un aumento de cuatro veces o más el nivel de la hemaglutinina indirecta en 38 de estos sujetos.

Se desarrolló una faringitis febril en 25 sujetos, -- que fué de carácter exudativo en 21 y no exudativo en 4.

Aproximadamente en la mitad de los que tenían afec--

ción faríngea apareció adenopatía cervical y una cuarta parte se quejó de aspereza de garganta. Es significativamente más -- frecuente la faringitis exudativa en los que no tenían anti--- cuerpos previos a la inoculación; estos hallazgos sugieren que M. hominis tipo 1 es capaz de causar faringitis exudativa en - condiciones experimentales. (78)

#### Uretritis no Gonocócica.

El término abarca tres grandes grupos de enfermedad humana: 1) bacteriana, debida a *Proteus*, *Haemophilus*, *Neisse--* *ria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y otras bacterias; 2) por - flagelados como *Trichomonas vaginalis*, y 3) no bacteriana, cau sada por gérmenes no fácilmente reconocibles en preparaciones - o aislados en un cultivo.

Hasta ahora no es posible establecer ningún microor ganismo como agente causal de la uretritis no gonocócica en - el varón. (37)

En 1937 se aislaron *Mycoplasma* de los genitales, con una sola excepción, todas se referían a una colonia típica, -- grande de *Mycoplasma*. Sin embargo, se encontraron también en - individuos normales y se pensó que sólo en determinadas cir--- cunstancias no conocidas podían producir la enfermedad y que - de modo habitual serían saprofitos.

En 1956 se descubrió un miembro del grupo *Mycoplasma*

como cepa T ( de "tiny" diminuto en inglés) por el pequeño tamaño de las colonias y morfología característica. (23)

Actualmente se responsabiliza a Mycoplasma de esta enfermedad.

Los primeros síntomas de la uretritis no gonocócica son; la aparición de una secreción uretral mucopurulenta que se acompaña de disuria, tenesmo y escosor local.

Casi sin excepción se asocia el dato de contacto sexual previo, posteriormente se producen episodios intermitentes de uretritis, haciéndose crónica la enfermedad y afectando probablemente la glándula prostática.

El diagnóstico de laboratorio de la cepa T se hace por examen directo de las extensiones teñidas y por el cultivo de secreción uretral. El examen directo de las extensiones revela pequeños cuerpos intracitoplásmicos de aspecto cocobacilar y finas estructuras filamentosas; parece que, en el curso de la infección, estos filamentos aparecen en el citoplasma -- del epitelio uretral, al progresar la enfermedad se encuentran también extracelularmente.

Para aislar primariamente al Mycoplasma en cultivo, se inoculan directamente las placas de agar suero con material obtenido por raspado uretral directo. (85)

La cepa T se puede diferenciar del Mycoplasma geni--

tal humano corriente, observando sus características bioquímicas o empleando pruebas específicas para la diferenciación.

Las cepas T se inhiben en cultivo añadiendo al medio acetato de talio al 1/500, también se inhiben cuando se añade al medio eritromicina.

Cuando desarrolla Mycoplasma en las colonias grandes lo hace aún en presencia de estos fármacos.

Dentro de la esfera genitourinaria se ha querido implicar el género Mycoplasma en diversas patologías como son: - enfermedades inflamatorias de dicho aparato, sepsis, abortos - septicos, esterilidad etc... .

Los recién nacidos posiblemente adquieren Mycoplasma durante su paso por el canal del parto. No obstante, mientras los recién nacidos varones apenas poseen Mycoplasma en el tracto genital, aproximadamente un tercio de los recién nacidos de sexo femenino están colonizados por Mycoplasma T y M. hominis.

La proporción de colonización decrece con la edad, - hasta aproximadamente el primer año de vida, en que prácticamente es nula. En la pubertad, es raro encontrar a los hombres colonizados por Mycoplasma, pero en edades posteriores la frecuencia aumenta con la actividad sexual. En cuanto a la mujer, después de la pubertad parece ser que la colonización tiene lugar por contacto sexual, ya que en mujeres adultas sin histo--

ria de contacto sexual hay muy poca colonización, mientras que en mujeres que han tenido relaciones sexuales con un solo hombre hay un 37 % de colonización y las que han tenido relaciones con más de un hombre existe un 75 % de colonización; existiendo una mayor frecuencia de *Mycoplasma T*. Parece ser que la frecuencia aumenta con las clases sociales inferiores, no está clara la relación con el embarazo y se ha observado que la frecuencia decrece en las postmenopáusicas. (60)

#### Enfermedades inflamatorias de la pelvis:

Existe cierta evidencia de que *M. hominis* puede ser responsable de cierto número de enfermedades inflamatorias de la pelvis, en unos casos por el aislamiento y cultivo del género y en otros por la demostración serológica de infección.

Las estadísticas más significativas son las de Mardh y Nestrom (86), que efectuaron cultivos en 52 pacientes en --- quienes se diagnosticó salpingitis por laparoscopia, de aspirados de los orificios abdominales o de punciones de las trompas. Además, se efectuó un control de 50 pacientes con inflamaciones genitales bajas y de 50 mujeres sanas. *Mycoplasma hominis* fué aislado en cuatro ocasiones de las trompas de Falopio de las mujeres con salpingitis y *Mycoplasma T* en dos ocasiones.

En contraste, en los dos grupos control no se aisló *Mycoplasma* de las trompas en ningún caso.

Estos datos nos pueden sugerir la patogenicidad de - M. hominis en las enfermedades inflamatorias de la pelvis, --- mientras que los Mycoplasma T, quizá menos estudiados, aunque fueron aislados en dos casos y uno de estos demostró elevación cuádruple del título de anticuerpos, no poseen tanta evidencia de patogenicidad. (86)

#### Aborto séptico.

En los últimos años ha crecido el interés por aclarar el significado de los aislamientos repetidos de M. hominis hechos a partir de placentas, líquido amniótico y tejidos fetales.

Jones (63), en uno de sus trabajos sobre el tema, -- aisló M. hominis en cultivo puro de los pulmones y en un hígado de un total de cinco entre 62 fetos abortados, coexistiendo además reacción inflamatoria. El hecho de que sólo se hubiera aislado Mycoplasma de los pulmones, excepto en un caso, aboga porque la colonización provenga del líquido amniótico en vez de que sea por vía hemática. Asimismo halló en otros estudios, que 3 de 36 mujeres experimentaron una significativa elevación del título de anticuerpos ante M. hominis después del aborto, existiendo estados febriles en todas ellas en el momento del aborto. (63)

En estudios realizados por Harwick y Cols. (20) apar

te de haber aislado M. hominis por amniocentesis de cuatro --- embarazadas que se hallaban febriles, aislaron dicho germen de la sangre del 7.8 % de 51 mujeres que tuvieron abortos febriles, mientras que nunca fué aislado de la sangre de 53 mujeres con abortos afebriles ni de 102 embarazadas normales, destacando que en la mitad de las mujeres con abortos febriles hubo una elevación significativa del título de anticuerpos ante una o --- más cepas de M. hominis, aunque en las mujeres que tuvieron -- abortos apiréticos aproximadamente un 25 % de elevaciones de - anticuerpos.

Los datos expuestos hasta ahora, junto con el mismo índice de curación para las mujeres con abortos febriles con - o sin antibioticoterapia con tetraciclinas, deja todavía la -- incógnita del papel etiológico de M. hominis en el aborto --- séptico, aunque parece existir una cierta relación. El papel - de Mycoplasma T se halla aún menos claro, aunque existen algunos trabajos, como los de Romano y cols: en que comunican su - aislamiento a partir de pulmones de algunos fetos abortados. -

(63)

#### Infecciones puerperales.

Parece ser que el tracto genital puede servir de foco a infecciones generalizadas en septicemias postparto o postaborto séptico, con evidencia, en algunos casos, de respuesta

serológica, siendo aislados M. hominis y T- Mycoplasma de hemo cultivos de útero y de líquido amniótico.

La relación de la colonización vaginal por Mycoplasma con la fiebre postparto no está perfectamente clara. En un estudio, 5 de 13 mujeres con cultivo prenatal positivo, desarrollaron un aumento cuádruple del título de anticuerpos y 6 de las 13 mujeres con cultivo prenatal positivo, desarrollaron un aumento cuádruple del título de anticuerpos y 6 de las 13 desarrollaron fiebre postparto.

En cambio, de 12 con cultivo prenatal negativo, sólo dos tuvieron un postparto sin denotar aumento del título de anticuerpos.

Otros autores aislaron M. hominis en el cérvix (32%) de 37 mujeres con postparto febril, mientras que sólo lo aislaron en un 10 % de un grupo afebril de control, hayando respuestas serológicas en pacientes febriles.

En contraposición a lo dicho, surgen trabajos como los de McCormack que en un estudio de 388 infecciones puerperales, sólo aisló M. hominis en dos de 27 mujeres con postparto febril mientras que también lo aisló en una mujer apirética de un grupo control de 31. Las tres tuvieron respuesta serológica apreciable, aunque se curaron espontáneamente. Parece ser que en los casos en que se ha podido encontrar postparto febril li

gado a colonización micoplasmática con serología positiva, hay una mayor frecuencia de mujeres que habían tenido una ruptura precoz de las membranas amnióticas, Mycoplasma T han sido aislados en 3 de 5 pacientes con postparto febril, pero sin respuesta serológica. (86)

Como un caso curioso se tiene el comunicado de Caspi y cols. (63) de una mujer embarazada mediante inseminación artificial, quien durante el séptimo mes del embarazo desarrolló una sepsis, que demostró ser por Mycoplasma T, tras haberse roto la fuente. Después del parto, que fué normal, se aisló Mycoplasma T de la sangre y del moco cervical de la niña, así como también se encontró que el eyaculado del donante, estaba libre de Mycoplasma.

#### Mycoplasma e infertilidad.

Gnarpe y Friberg (20) creyeron demostrar en un estudio, el papel etiológico de Mycoplasma T en ciertos casos de esterilidad, al hallarlos en moco cervical y semen en un 85 % de 52 parejas estériles, en contra de una proporción del 26 % en parejas fértiles, añadiendo a este hecho que 15 de las parejas estériles se volvieron fecundas después del tratamiento durante 5 meses con doxiciclina. Desgraciadamente, estas cifras no han podido ser ratificadas ya que otros autores han encontrado porcentajes mucho más altos en parejas normales e incluso en gestantes. No obstante, en vista de la frecuencia con --

que se aísla M. hominis y Mycoplasma T de las trompas inflamadas, es posible que estos pueden producir una esterilidad por secuelas inflamatorio-cicatrizales, tal como lo haría M. gonorrhoeae.

#### Artritis reumatoide y otras colagenosis.

A la vista del artrotropismo de muchos Mycoplasma de origen animal y de la patología por ellos producida, se ha intentado demostrar su papel etiológico en la artritis reumatoide en el hombre, aunque los resultados no han sido del todo satisfactorios.

Chandler y cols. (62), intentaron demostrar una etiología infecciosa de la artritis reumatoide mediante pruebas serológicas ante 30 agentes diferentes. A pesar de la minuciosidad de los métodos y sistemas estadísticos, no se pudo demostrar serológicamente ninguna relación de la artritis reumatoide con ningún agente infeccioso. En una revisión reciente publicada por Morton (17) sobre el tema, se deja ver que algunos Mycoplasma que se pudieron aislar de los líquidos sinoviales - en diferentes series de investigaciones, la mayoría de las veces no se pudieron clasificar en especies, principalmente por la dificultad de mantenerlos en subcultivo.

Los trabajos que se han encontrado más valorables son los de Wagner y Jonson y Williams y cols. (5)

Los primeros estudios de Janson y Wagner, demostraron

Mycoplasma en el líquido sinovial de 2 de 28 enfermos con artritis reumatoide, en estudios posteriores se encontraron niveles de aislamiento muy superiores. Jonson y cols., lo aislaron de 11 de 33 pacientes, añadiendo además que también pudieron ser aislados de dos pacientes con artritis reumatoide juvenil y de la médula ósea de 3 pacientes con LE sistémico. Todos los microorganismos aislados probaron ser serológicamente idénticos al Mycoplasma patógeno de las ratas, M. arthritidis.

Estos datos fueron corroborados en parte por Bona---dorff y cols. (5) al estudiar, mediante microscopio electrónico, un Mycoplasma aislado de la médula ósea de un enfermo con LE sistémico. Comparando las imágenes obtenidas por microscopio electrónico del microorganismo problema, con las obtenidas de uno ya identificado como M. arthritidis, resultaron ser semejantes, excepto en algún detalle, como son la frecuencia de visualización y la facilidad de multiplicarse en medios no enriquecidos.

Williams y cols. (76), por otra parte, en vista de que las pruebas estándar para la determinación de la presencia de anticuerpos, como son hemaglutinación indirecta, inhibición del metabolismo, difusión en gel o fijación del complemento, habían fracasado en la diferenciación de los enfermos con artritis reumatoide de los pacientes control introdujeron otra técnica que fué la prueba de migración leucocitaria mediante---

antígeno de membranas de M. fermentans. En una primera comunicación dichos autores que ya habían aislado M. fermentans del 39 % de enfermos, en contra del 8 % del grupo control sano, encontraron que había una inhibición de la migración leucocitaria en el 67 % de 43 enfermos afectados de artritis reumatoide mientras que en pacientes osteoatríticos, y en el grupo sano - de control, no existía positividad de dicha prueba, aportando la hipótesis de que las inmunoglobulinas presentes en el líquido sinovial, están firmemente unidas a la membrana micoplásmatica, pudiendo ser el estímulo para la producción del factor reumatoide.

En una segunda comunicación William y cols., en un estudio de 17 pacientes con artritis reumatoide, hallaron que la prueba de inhibición de la migración leucocitaria era positivo en 10 de dichos enfermos. Suprimiendo del grupo de enfermos -- los que ya estaban siguiendo tratamiento con sales de oro, encontraron que la proporción aumentaba, ya que la prueba resultó ser positiva en 9 de los 12 pacientes no tratados; es decir la proporción varió de un 59 % a un 75 %. Siempre teniendo como control un grupo de pacientes con osteoartritis y otro sano.

Esta observación, teniendo en cuenta que M. fermentans es inhibido por las sales de oro in vitro, por una parte apoya el posible papel etiológico de dicho organismo y, por -- otra parte, afirma la efectividad del tratamiento con sales de

oro. (76)

C) COMPLICACIONES.

Son relativamente poco frecuentes las complicaciones de las neumonías por M. pneumoniae. Algunas de estas revisten su caracter propio, al ser posible que aparezcan solas, sin indicio de infección respiratoria previa.

Las complicaciones se clasifican en la siguiente forma:

- a) Complicaciones dentro de la esfera respiratoria.
- b) Complicaciones extra-respiratorias.

A. Dentro de las complicaciones respiratorias de las neumonías por M. pneumoniae podemos considerar lo siguiente:

- 1.- Recaída: Con cierta frecuencia (10%) cierto número de enfermos, después de tener un curso favorable durante 5-6 días - se ha comprobado que vuelven a instaurar la fiebre y síntomas respiratorios, pudiendo incluso ser atacado un lóbulo - diferente al inicial.
- 2.- Sobreinfección: Las infecciones bacterianas secundarias -- son poco frecuentes, según Hers, (59) en una estadística - de 82 neumonías por Mycoplasma en personas previamente sanas sólo hubo sobreinfección bacteriana en el 6 %. Parece ser que hay más facilidad de sobreinfección en niños, destacando una estadística del mismo autor, durante una epide

mia, en la que se presentó una proporción del 68 % de sobre infecciones bacterianas a partir de 40 neumonías en niños - H. influenzae y neumococo son los más frecuentes causantes de sobreinfección, principalmente en niños, mientras que -- Staphylococcus aureus ocupa el segundo lugar, afectando más a los adultos. Se han descrito casos de dobles infecciones con virus conocidos, aportando Hers 11 casos en que 4 eran influenza A, dos por influenza B y cinco por adenovirus. (59)

3.- Afectación pleural.- Es considerada como complicación por no formar parte generalmente del cuadro clínico típico. No obstante, en un estudio de 20 neumonías por M. pneumoniae se hallaron cuatro casos de derrame pleural.

B. Dentro de las complicaciones extra-respiratorias, existen diversas posibilidades, según el órgano u órganos afectados.

a).- Complicaciones auditivas. La meningitis es una complicación relativamente frecuente de las infecciones por M. pneumoniae. Algunos autores la consideran dentro del contexto clínico de la enfermedad, mientras que otros la admiten sólo como complicación.

En cuanto a su frecuencia y característica, existen estadísticas variables. En un trabajo de Rifkind y cols. (7) - con 52 voluntarios a los que se les inoculó M. pneumoniae y de

los cuales a 25 se les había inyectado previamente anticuerpo de Eaton, se comprobó que entre los 27 individuos no inoculados con anticuerpos hubo tres casos de neumonías y 11 de meningitis, coincidiendo ambas entidades en un sujeto. No obstante, todos los casos de meningitis fueron asociados a sintomatología respiratoria alta, apareciendo en la mayoría de los casos después de ésta, ente los 5 y los 10 días después de la inoculación y persistiendo algo más que los síntomas respiratorios.

Por otra parte Sobelavski y cols. (43) actuando a la inversa, examinando un grupo de 20 pacientes (niños y adolescentes) con diagnóstico clínico de otitis media, lograron aislar M. pneumoniae en tres casos: dos de frotis faríngeo y esputo y uno mediante punción timpánica. Sólo dos presentaron elevación valorable del título de anticuerpo. Hers relata también un caso de otitis no bacteriana dentro de una serie de 82 neumonías por M. pneumoniae, mientras que Grayston, de una serie de enfermos (60) con enfermedad respiratoria causada por Mycoplasma encontró en nueve de ellos meningitis. (20)

Hjordis M. Foy (59) aporta en uno de sus trabajos la cifra del 23 % de afectaciones óticas secundarias a infecciones por M. pneumoniae. Esta afectación ótica en la mayoría de los casos sólomente consistía en una congestión de la membrana timpánica.

Como conclusión se puede decir que existe una verda-

dera correlación entre las infecciones por M. pneumoniae y las afecciones óticas, consistiendo éstas generalmente en otitis media, acompañándose en menor proporción de meningitis.

b).- Complicaciones Neurológicas. En 1958, cuando las técnicas de laboratorio no permitían el diagnóstico bacteriológico de M. pneumoniae, Yesnick (86) describió 38 pacientes con neumonía atípica primaria en los que se asociaban alteraciones del SNC: meningitis, encefalitis, mielitis transversa, hemiplejía y polirradiculoneuritis. Posteriormente, con los avances del diagnóstico bacteriológico y serológico se ha demostrado que M. pneumoniae puede producir enfermedad neurológica, ya sea como complicación de una enfermedad respiratoria, o como patología autónoma.

Podemos decir que, en general, las complicaciones neurológicas de las infecciones por M. pneumoniae son más frecuentes en los menores de 20 años (60%) con un predominio claro del sexo masculino por debajo de dicha edad (4:1).

Por término medio existe un intervalo de 1 a 3 semanas entre la instauración de la patología respiratoria previa, si la hay y el inicio de los síntomas neurológicos.

De acuerdo a la estadística presentada por Lerer, de 50 pacientes 15 desarrollaron polineurorradiculopatía, con parálisis flácida y arreflexia tendinosa. Un paciente sufrió --

afectación medular, con parálisis motora segmentaria. En 7 enfermos fue hallada disfunción cerebelosa en forma de ataxia. - En 36 enfermos fué hallada afectación cerebral en forma de encefalitis focal, encefalitis difusa y hemiplejía.

Diez casos correspondían al cuadro clínico de meningitis aséptica. En cuatro adultos se constató como único signo neurológico una psicosis tóxica.

En cuanto a los parámetros del laboratorio, la presión del LCR se halló elevada; en un 36 % de los individuos en quienes se practico investigaciones de las proteínas en LCR, generalmente éstas se encontraban algo elevadas y existía una ligera pleocitosis con predominio linfocitario. El pronóstico es peor en los pacientes menores de 14 años y en los afectados de encefalitis, radiculitis y mielitis, quedando en muchos de ellos lesiones radiculares.

En general, se acepta que en los enfermos ingresados en un centro hospitalario por neumonía debido a M. pneumoniae, existe un riesgo aproximado de un 7 % de complicaciones neurológicas.

De todo lo que se ha expuesto anteriormente se puede concluir que vale la pena practicar pruebas diagnósticas para M. pneumoniae en los casos de meningitis asépticas u otras neuropatías de origen o evolución poco claras, ya que parece demost

trada la presentación de cuadros neurológicos en el curso de una afección respiratoria previa.

El mecanismo de producción de estos síndromes neurológicos está poco aclarado, ya que si bien parece seguro el diagnóstico de una infección por M.pneumoniae en actividades (por la elevación del título de anticuerpos), tan solo existe un caso descrito en que se consiguió aislar Mycoplasma del LCR. Se han remitido diversas teorías, como podría ser la formación de una neurotoxina o quizá la más probable por un mecanismo inmunológico.

c).- Complicaciones cutáneas. Son varias las complicaciones que se hallan relacionadas con las infecciones por M. pneumoniae: urticaria, erupciones de tipo vesiculopustular y maculopapulosas, eritema nudoso y eritema multiforme o síndrome de Stevens-Johnson. En algunos casos la relación con M. pneumoniae puede quedar enmarcada, como en los casos en que los pacientes han estado tomando medicamentos; podríamos incluir aquí las púrpuras trombocitopénicas, pero se han incluido en mejor forma dentro de las complicaciones hematológicas.

La más característica de las complicaciones cutáneas es el síndrome de Stevens Johnson. El eritema multiforme fué descrito por primera vez por Hebra (15) para definir la aparición de máculas, pápulas, vesículas y ampollas de color rojo o violeta, distribuidas por lo general simétricamente, en la na--

por parte de la superficie del organismo. En algunos casos de los pacientes afectados por este síndrome, se ha podido aislar M. pneumoniae de la nasofaringe y del líquido ampollar.

Bianchine y cols., (86) en una estadística de 130 enfermos con eritema multiforme, hallaron que sólo en el 20 % se podía afirmar que el eritema multiforme poseía un antecedente claro de enfermedad respiratoria, mientras que un 30 % estaba relacionado con la ingesta de medicamentos, quedando un 50% restante sin aclarar su relación con una u otra causa, ya que poseían los dos antecedentes. Sería interesante destacar a qué edad es la mayor incidencia de las infecciones por M. pneumoniae. En trece casos de eritema multiforme, pudieron aislarlo de las ampollas de dos de ellos, los más graves, detectándose además una elevación del título de anticuerpos en estos casos. En 11 de los pacientes restantes de menor gravedad, pudieron aislar M. pneumoniae de la faringe de tres de ellos, aunque no se encontró elevación del título de anticuerpos.

Por otra parte, Ludlam y cols, (69) describen un aumento del título de anticuerpos para M. pneumoniae en cuatro de cinco casos consecutivos estudiados, afectados de eritema multiforme. Todos ellos poseían antecedentes de enfermedad respiratoria, puede afirmar, que M. pneumoniae puede ser-

uno de los factores desencadenantes de un eritema multiforme o del síndrome de Stevens-Johnson.

Como una complicación aparte, podemos añadir un caso descrito por Grayston y cols., en que una chica de 15 años afectada de neumonía por M. pneumoniae (demostrada por aislamiento), desarrollo un eritema nodoso. (69)

d).- Complicaciones digestivas.

Se ha escrito poco sobre las complicaciones digestivas a partir de las infecciones por M. pneumoniae. Estas, al parecer, sólo se limitan a la esfera pancreática, produciendo pancreatitis aguda de mayor o menor intensidad.

March y Boursing son los únicos que han descrito pancreatitis asociadas a neumonías por M. pneumoniae. Se trata de una serie de 6 pacientes recopilados durante 9 meses. Todos -- ellos poseían antecedentes de neumonía por M. pneumoniae diagnosticada por elevación en la tasa de fijación del complemento, la determinación de anticuerpos inhibidores del metabolismo, -- de la glucosa y por la tasa de crioaglutininas, además de los criterios clínicos radiológicos. De los 6 pacientes, 4 desarrollaron una pancreatitis aguda clínica y biológicamente, al cabo de una o dos semanas del inicio de los síntomas respiratorios. Los niveles de amilasa en sangre y en orina permanecieron elevados entre 3 y 18 semanas. Los otros dos desarrollaron

una forma sub-clínica de pancreatitis, siendo detectada únicamente por las pruebas biológicas. Se registró la muerte de uno de los pacientes, debida a un coma hiperosmolar y trombocitopenia. Dos de ellos desarrollaron diabetes mellitus, mientras -- que uno sólo sufrió una hiperglicemia transitoria. No está muy clara la fisiopatología, por una parte, no puede ser debida al efecto citotóxico directo de M. pneumoniae sobre el páncreas, -- aunque luego no exista colonización de él, ya que el tejido necrótico es muy rico en lisolecitinas y lipasas, que tienen -- efecto citolítico sobre M. pneumoniae. Otra teoría sería la -- causada por la inflamación y/o edema de la ampolla de Water, -- lo cual produciría aumento de la presión intracanalicular y pancreatitis subsiguiente.

c) Complicaciones Hematológicas.

Aunque el 50 % de las neumonías por Mycoplasma pneumoniae cursan con elevaciones transitorias del título de crioaglutininas, sólo en un pequeño porcentaje existe hemólisis -- intravascular considerable clínicamente.

Generalmente, la hemólisis sólo ocurre cuando la fiebre es persistente, cuando hay enfriamiento de las extremidades o cuando los títulos de crioaglutininas son considerablemente altos. En relación a la elevación de dichos títulos, diremos que es más frecuente encontrar cifras altas en los menores de 20 años que en los que están por encima de esa edad. --

Frecuentemente la hemólisis es de poca intensidad y se recupera fácilmente. Se han descrito también fenómenos de trombosis venosa periférica en infecciones por M. pneumoniae, aunque son muy poco frecuentes. Como en otras infecciones, se ha registrado en ocasiones, descenso del número de plaquetas y de los factores de la coagulación, aunque la incidencia es menor en las infecciones por M. pneumoniae. (35)

f) Complicaciones Articulares.

El primer indicio de estas manifestaciones fue descrito por George y cols. (76) en una epidemia de infecciones por M. Pneumoniae en una base de U.S.A. en que un familiar de un soldado desarrolló una artritis aguda de rodilla con elevación transitoria de crioaglutininas.

Posteriormente han sido descritos 3 casos por Lambert que desarrollaron una sintomatología clínica compatible con reumatismo poliarticular agudo tras manifestaciones respiratorias 2 de ellos con neumonitis. El tiempo de instauración oscila entre unos días a dos semanas después del comienzo de los síndromes respiratorios. Sólo un paciente desarrolló una artritis -- franca, mientras que los otros dos, sólo experimentaban artral<sub>g</sub>ias y limitación funcional de las articulaciones. En todas -- ellos se realizaron determinaciones del título de antiestreptolisin<sub>as</sub> que resultaron negativas, En cambio, la determinación-

del título de crioaglutininas y de la tasa de fijación del complemento para M. pneumoniae resultaron valorables en todos --- ellos. (5)

Otro caso descrito por Weinstein y cols. (60) fue un paciente que ingresó con un diagnóstico de presunción de fiebre reumática o de artreitis reumatoide juvenil, diagnósticos fueron desechados por exámenes de laboratorio, hallándose evidencias de infección por M. pneumoniae. A este caso se añade una revisión de 7 casos descritos en la literatura británica, de los siete, cinco eran adolescentes, todos poseían antecedentes respiratorios. Las articulaciones más afectadas en orden de incidencia fueron rodillas, tobillos, hombros y codos. (62)

Sólo cuatro de los pacientes desarrollaron una artritis franca con signos inflamatorios o derrame sinovial, padeciendo los otros tres, sólo dolor articular. En todos se demostró una elevación significativa del título de fijación de complemento para M. pneumoniae.

#### g) Otras Complicaciones.

En las infecciones por M. pneumoniae se han descrito complicaciones cardíacas, como miocarditis y/o pericarditis. Algunas veces las pericarditis diagnosticadas clínicas o electrocardiográficamente pueden ir asociadas a las pancreatitis agudas, secundarias a infecciones por M. pneumoniae, aunque generalmente van estrechamente ligadas a los síntomas respiratorios. En rea

lidad es una complicación poco frecuente, Hers, en una serie de neumonías estudiadas (86) sólo halló 3 casos de miocarditis pericarditis, mientras que Grayston y cols. sólo comunican una pericarditis en una larga serie de casi 200 pacientes . (62)

Gerzen y cols. (43) en un estudio de 45 pacientes -- con miocarditis, hallaron evidencias de infección por M. pneumoniae en dos de ellos. Generalmente cursa la forma asistomática y con buen pronóstico, aunque Rosner y cols. (43) describieron una disociación atrioventricular completa.

Sólo se conocen referencias de afección renal en un caso descrito por Lebaco y cols. (20), en un niño en el que -- también se encontró patología respiratoria y nerviosa. La primera consistía en una neumonía atípica primaria por M. pneumoniae diagnosticada serológicamente. La afectación renal, por su clínica y evolución, fue catalogada de nefritis intersticial, siendodescartada cualquier otra causa (estreptococo, y otros virus etc...) (20).

#### D) EPIDEMIOLOGIA.

##### Epidemias ocurridas por infecciones causadas por M. pneumoniae.

La neumonía debida a M. pneumoniae fué controlada por un gran grupo de médicos importantes de Seattle, Washington, - entre 1963 y 1975. La enfermedad fué diagnosticada por aislamiento de M. pneumoniae y por aumento significativos en la fi-

jación del complemento. Las infecciones fueron endémicas sin significado de fluctuaciones estacionales.

Las infecciones con M. pneumoniae son endémicas en áreas densamente pobladas, afectan principalmente a los niños en edad escolar, pero también se presentan en sitios como cuarteles militares y colegios poblados.

En el estudio total del período (Dic. 1 de 1963 a -- Feb. 28 de 1975). se registraron 15.141 casos de neumonía, se obtuvieron un total de 947 aislamientos de M. pneumoniae (15%) de las gargantas de 6,197 pacientes con neumoniae. De suero obtenido de 4,052 pacientes con neumonía, 8 % habían aumentado en el título y aislamiento de M. pneumoniae y un 5 % había aumentado en el título de anticuerpos, pero el cultivo de la garganta fué negativo. (52)

Además, el 8 % tenían un título mayor o igual a 1:32 sin aumento cuádruple, en patrones sugestivos de reciente infección.

La neumonía por M. pneumoniae, la mayoría de las veces ha sido endémica, sólo se han reconocido dos epidemias definidas.

La tasa aumentó en 1970 y el segundo brote epidémico claro no ocurrió sino hasta 1974.

La producción de casos debida a M. pneumoniae alcan-

zó un 42 % en julio de 1966 y 50 % en el invierno de 1974.

La más alta de las tasas de neumonía causada por -- M. pneumoniae fué en niños escolares, cuando la neumonía de -- otras etiologías no fue relativamente común. Las tasas de todas las neumonías fueron más altas en el género masculino que en el femenino, en los muy jóvenes y en los muy viejos.

Mediante el estudio, se observó que la tasa de neumonías causadas por M. pneumoniae fueron más altas para el género femenino que para el masculino en un grupo de 30 a 39 años de edad. Este grupo de edad incluyó muchas madres de niños escolares. Los patrones de edades idénticos se observaron en ambas epidemias. Las tasas de neumonía debidas a M. pneumoniae fueron más altas en niños con edades entre 5 y 9 y la siguiente cantidad elevada fue en niños de 10 a 14 años.

Los padecimientos de aislamiento fueron más eficaces que los métodos serológicos en personas de 2 a 30 años de edad pero en niños pequeños y adultos viejos, cerca de la mitad de las infecciones fueron diagnosticadas solo por métodos serológicos.

La incidencia de neumonía por M. pneumoniae entre niños de 2 a 4 años de edad fue de doble que con los demás niños menores.

En infantes menores de 6 meses de edad, la neumonía-

por M. pneumoniae fue rara: sólo en uno se logró aislar y en dos se presentaron aumentos serológicos.

La incidencia en la cantidad de infecciones por M. pneumoniae, básicamente en niños escolares sanos, fue demostrada en muertes de sangre anuales. Las tasas de infección fueron particularmente altas de 1966 a 1967.

La tasa de infección en la comunidad fue 14 % en niños de 6 a 13 años de edad en la epidemia de 1967, y la tasa de neumonía debida a M. pneumoniae, fue de cerca de 10 a 14 -- por 1000 niños entre 5 y 14 años de edad en la epidemia de 1967.

(31)

Las tasas de infección en personas de 10 a 21 años de edad (principalmente entre 13 a 19 años de edad) fue reflejada en dos muestras anuales: de mayo de 1973 a mayo de 1974, 35 % y de mayo de 1974 a mayo de 1975 10 %.

Las tasas de infección por edad y las muestras de -- miembros de familia anualmente desde 1972, dieron evidencia para tasas de infección relativamente altas de un promedio del 6 % de 15 a 19 años de edad, comparados con un 8 % de niños de 5 a 9 años de edad.

Sólo en el verano, estas epidemias por M. pneumoniae claramente aumentaron el total de las tasas de neumonías.

Las epidemias de larga duración con intervalos de 4-

a 11.5 años han sido reportadas en Dinamarca en 1962 - 1963, - 1967-1969 y 1972 y en Inglaterra en 1970-1972 y 1974-1975.

Una periodicidad similar fue observada en la Universidad de Wisconsin, con epidemias en 1954-1955, 1960-1961 y 1964 1965. (38)

Las epidemias fueron notificadas también en una población pediátrica en Carolina del Norte en 1964-1965 y 1969-1970.

En la base de la fuerza aérea en Louisiana se presentaron epidemias en 1960 y 1965, que no afectaron las ciudades y otras partes del continente Norteamericano al mismo tiempo.

Una cantidad significativa en los títulos de anticuerpos y títulos altos sin aislamiento de M. pneumoniae se vio principalmente cuando las infecciones por M. pneumoniae fueron epidémicas.

Los cultivos de garganta falsos positivos son raros. Los niños quizá presentan cultivos positivos casi 6 semanas después de la infección; sin embargo, los cultivos tomados a las 6 semanas de 2,354 niños escolares en un período de 7 meses en 1965, se aislaron solo en 3 de ellos.

Lo significativo del aislamiento y de las tasas de los títulos en niños menores de 5 años de edad, pueden ser cuestionadas en base a la alta tasa de infecciones asintomáti-

cas observadas en niños.

Dos familias estudiadas en Seattle mostraron tasas familiares de infección para todas las personas menores de 15 años de edad; este dato sugiere la baja proporción de infecciones con dirección a ser neumonías, en niños menores de 5 años de edad.

La proporción de niños infectados, entre 5 y 14 años demostrando neumonía fue mucho más lata, aproximadamente 10 %. Estudios previos en una población de niños escolares, indicó que el 13 % de estos estudios sugirieron que el 15 % al 18 % presentaron diagnóstico de neumonía en el mismo grupo de edad.

La baja tasa de neumonía debida a M. pneumoniae en - infantes menores de 6 meses de edad sugiere que el anticuerpo - sirve como protector.

Ha sido realizada una hipótesis de que la infiltración pulmonar representa una respuesta inmune exagerada a la infección secundaria después de la infección primaria.

Esto quizá explique la alta tasa de neumonías causadas por M. pneumoniae en niños de 5 a 9 años de edad, pero por otra parte, posiblemente se adquirió inmunidad parcial, que ha sido dirigida hacia la baja tasa de infección por neumonía contra la alta tasa de infección en niños mayores.

Las tasas de neumonía por M. pneumoniae entre 30 a 39

años de edad tanto en mujeres como en hombre de la misma edad sugiere que la inmunidad parcial puede vencer en una exposición intensiva.

## 2) PRINCIPALES ENFERMEDADES EN ANIMALES.

### A) PLEURONEUMONIA BOVINA.

La primera de estas formas en ser aislada y estudiada fue el organismo causal de la pleuropneumonía en el ganado, la enfermedad se encuentra diseminada en todo el mundo, excepto en la India, Europa occidental y Estados Unidos, a este último país ha sido importada varias veces, pero finalmente erradicada mediante el sacrificio de los animales infectados y desde 1892 no ha vuelto a presentarse..

La enfermedad natural en el ganado se caracteriza -- por extensa condensación y derrame subpleural en uno o ambos pulmones y el microorganismo se encuentra en abundantes cantidades en el exudado seroso. Se disemina lentamente en los rebaños y puede adptar una forma crónica debido a la encapsulación de los focos de infección.

Ocasionalmente hay infección articular en animales jóvenes. La enfermedad natural no ha sido producida en el ganado mediante inoculación de exudado seroso, infeccioso o de cultivos, pero se produce un edema extenso y se disemina desde el sitio de la inoculación; además, se presenta reacción febril y

algunas veces muerte. Al parecer el organismo carece de poder patógeno para los animales de experimentación usuales y para el hombre; se ha comunicado que cultivos en sueros de caballo o cordero son infecciosos para éste y para las cabras, en tanto que los de medios de suero de bovino no lo son.

Agalactia contagiosa del cordero y de la cabra.

Esta enfermedad no obstante su nombre, es una infección generalizada que afecta tanto a los machos como a las hembras. Se presenta sólo en el sur de Europa y de Noráfrica; la agalactia o mastitis de estos animales en Estados Unidos, es de otra etiología.

La lesión se presenta en las articulaciones, en los ojos y en las glándulas mamarias de la hembras.

El microorganismo se presenta tempranamente en la sangre, posteriormente puede aislarse de regiones afectadas y de las secreciones mamarias.

El segundo miembro del grupo en estudio, fué aislado por Bridré y Donatien, en 1923, bioquímica y morfológicamente es muy semejante al organismo de la pleuropneumonía y a otros miembros del grupo, pero es deferente inmunológicamente y en su patogenicidad, que es característica.

La enfermedad se reproduce fácilmente por inoculación de corderos y cabras mediante cultivos.

### Variedad canina.

Los organismos que forman parte del grupo de la pleuroneumonía también se han encontrado en perros.

En 1934 Shoetensak (14) comunicó haber cultivado un organismo de esta variedad a partir de secreción nasal purulenta en perros con distermias, que llamó Asterococcus canis. En estudios posteriores se demostraron otros organismos, parece que existen dos variedades inmunológicamente diferentes, que se llamaron variedad 1 y variedad 2, respectivamente. Sus relaciones etiológicas postuladas con la distermia, no están establecidas, generalmente es considerada como una enfermedad viral.

### Variedades de la Rata.

Klieneberger-Nobel han aislado varios microorganismos causantes de la pleuroneumonía de las vías respiratorias y de otras partes, en ratas normales y enfermas. (14)

Otros han aislado organismos semejantes, de ratas con poliartritis y con extremidades inflamadas, llamados M. arthritidis, que se caracterizan por producir lesiones piógenas crónicas. Estos comprenden series L de cepas, en las cuales se designan con subíndices. Ahora parece haber tres variedades diferentes, biológica e inmunológicamente a saber, L<sub>1</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub>.

La cepa L<sub>5</sub> fué aislada de cobayos y estudiada insuficientemente antes de perderse el cultivo al iniciarse la guerra.

La cepa descrita como L<sub>5</sub> es inmunológicamente idéntica a la variedad A del ratón, la L<sub>6</sub> ha sido insuficientemente estudiada, y la L<sub>7</sub> es idéntica a la L<sub>4</sub>.

Ha merecido considerable interés la relación aparente de L<sub>1</sub> con S. moniliformis.

Klieneberger-Nobel han podido aislar la forma L<sub>1</sub> de muchas cepas y reservas de cultivo de S. moniliformis, debiendo subrayarse que este organismo es un parásito natural de la nasofaringe de ratas y ratones. Sostiene que L<sub>1</sub> y el estreptobacilo coexisten en simbiosis, al haberse podido separar ambos basándose en la deferente resistencia al calor y al envejecimiento, observando L<sub>1</sub> de la rata en ausencia de S. moniliformis, y han transportado cepas L<sub>1</sub> en muchos trasplantes sin observar su reaparición.

Estas formas L se relacionan etiológicamente, en algunos casos por lo menos, con infecciones crónicas relativamente benignas en ratas, en las cuales la afección articular y la poliartritis, no son manifestaciones poco frecuentes.

#### Variedades en el Ratón.

Sabin divide los organismos del tipo de la pleurop--

neumonía encontrados en el ratón, en cinco variedades, designadas A, B, C, D y E. La variedad A se encuentra en el ratón normal, a veces en el cerebro y frecuentemente en los ojos, mucosa nasal y pulmones de portadores. La inoculación intracerebral -- del ratón produce ataxia caracterizada por giro o bamboleo del cuerpo.

Las lesiones cerebrales y los síntomas que ocasionan, se atribuyen a la acción de una toxina soluble producida por el microorganismo.

Un organismo inmunológicamente idéntico fué aislado por Pinflay y cols., de ratones afectados con "Enfermedad de bamboleo" y designado como L<sub>5</sub>.

La variedad B también se ha encontrado en ratones -- normales y no sólo es inmunológicamente diferente, sino que -- produce casi exclusivamente una artritis progresiva, cuando se inocula por vía parenteral al ratón.

Las variedades C, D, y E son semejantes en su patogenicidad, pero inmunológicamente son diferentes.

#### Variedades Saprofitas.

Los organismos del tipo de la pleuropneumonía posiblemente con existencia saprofita natural, han sido encontrados -- por Laidlaw y Elford (66) en las aguas negras de Londres. Semejan mucho a las formas parasitarias, tanto por su morfología --

como por su forma de cultivo y caen dentro de los grupos inmunológicos designados como variedades A, B y C, ninguna fué patógena para los animales de experimentación. En Alemania se han encontrado formas semejantes en el estiércol y en otras materias orgánicas en descomposición.

Se encuentran asociadas con una variedad de enfermedades en los animales, varias especies de Mycoplasma, por ejemplo, la causa principal de la neumonía en los puercos es M. hyopneumoniae.

Betts (98) describió las características clínicas de la enfermedad, y muchos investigadores posteriormente han coincidido con su descripción.

El exámen microscópico de los tejidos pulmonares removidos de puercos infectados durante un largo período de tiempo, reveló un material parecido al Mycoplasma cercano a los cilios de las células epiteliales de los bronquios, junto con un reducido número de cilios.

No obstante, se necesita una mayor caracterización de varias etapas degenerativas de la enfermedad porque las infecciones secundarias con bacterias, virus y otros Mycoplasma o nemátodos, ocurren comúnmente en el huésped, en caso de enfermedad se puede alterar la respuesta al tejido y resultar cambios morfológicos más severos.

M. hyopneumoniae interacciona principalmente con el huésped en las superficies epiteliales ciliadas del aparato respiratorio. La investigación de esta infección en cultivos de tejidos respiratorios porcinos con microscopía electrónica, permite una visión única de gran resolución de las áreas superficiales de los tejidos, que se podría comparar con otras observaciones microscópicas.

Este estudio realizado es muy importante debido a que como se sabe, las células columnares epiteliales pseudoestratificadas ciliares de la tráquea y de los bronquios pulmonares proximales, junto con las secreciones mucosas y los macrófagos alveolares, juegan un papel importante para remover diversas partículas inhaladas y organismos originadores de enfermedades del aparato respiratorio. Los cilios normales del árbol traqueobronquial tienen una ligera curvatura y se flexionan hacia la laringe, que se toma como una evidencia de los latidos ciliares direccionales por facilitar el paso por las vías respiratorias. Si se rompen estos cilios, entonces se deteriora la eficiencia de la limpieza de las vías respiratorias.

Así, como se ve por los efectos citopatológicos a este respecto, M. hyopneumoniae podría ser nocivo para el huésped. Este organismo es el único agente que al inocularse a los cerdos, originará neumonía enzoótica porcina.

Los resultados indican que un inóculo relativamente-bajo de M. hyopneumoniae y libre de otros microorganismos, ocasiona daños focales in vitro en los tejidos del aparato respiratorio porcino. Es probable que el organismo induzca la pérdida de cilios al elaborar una sustancia tóxica o una enzima. -- Una vez que se han perdido cilios, el organismo estará localizado como resultado del movimiento portector disminuido de la capa mucosa, y permitirá la adhesión a las partes fijadas de las células epiteliales de anillos traqueales o a las células epiteliales pulmonares.

Los efectos de M. hyopneumoniae sobre los cultivos porcinos de anillos traqueales y de pulmones, se asemejan a -- los que ocasiona M. pneumoniae, el cual es un patógeno respiratorio para el hombre.

En la actualidad no se sabe en forma específica cómo es que M. hyopneumoniae origina efectos citopatológicos. Los organismos pueden ocasionar el efecto al producir una sustancia tóxica, al infestar como parásitos y destruir las células o al rivalizar con los cultivos de órganos para materia nutritiva. Parece poco probable que estos efectos se presentaran para liberar componentes celulares de fibroblastos de pulmón porcino. No se presentó ningún efecto citopatológico aparente con algunas cepas de M. hyopneumoniae en cultivos de anillos tra--

queales porcinos y de tejido primario de riñon de cerdo. En -- los casos in vivo, M. hyopneumoniae ocasiona daño específico -- a las células epiteliales ciliadas del aparato respiratorio al disminuir el número de cilios. (14)

Se ha demostrado que las cepas virulentas de M. --- hyopneumoniae utilizadas en la investigación, recién han demostrado ser la cual de las lesiones pulmonares en cerdos hembras que derivaron en una histerectomía y las cepas aparentaron ser todas inmunológicamente semejantes.

En los cultivos de órganos se encuentran presentes -- células totalmente diferenciadas, que podrán variar ampliamente en su sensibilidad para las infecciones micoplasmatales.

Infecciones causadas por M. hominis en monos.

M. hominis, habitante común de las mucosas del tracto genitourinario en humanos y animales, en un estudio realizado recientemente, se inoculó en forma directa en los tubos uterinos de cinco monos hembras, cercopitecos verdes laparotomizados. Pocos días después, todos los animales desarrollaron salpingitis y parametritis aguda.

Aunque no había signos clínicos de una enfermedad -- abierta, la patología delicada se caracterizó por una zona edematosa pronunciada e hiperemia de las trompas y del parametrio.

Microscópicamente se encontraron infiltraciones celulares de linfocitos y algunos leucocitos polimorfonucleares en

una fase aguda en las capas subserosa y muscular de las trompas y en el parametrio.

En una etapa posterior se presentó tejido granuloso y necrosis de grasa. La infección se asoció con una marcada respuesta de anticuerpos y un incremento moderado de la tasa de sedimentación de eritrocitos y del número de leucocitos.

La capacidad que tiene M. hominis para ocasionarle salpingitis y parametritis a un primate, parece que le añadiría algo bastante significativo a la evidencia disponible, sugiriéndole un papel etiológico a este organismo en enfermedades inflamatorias de los genitales femeninos internos en los humanos.

El primer aislamiento de Mycoplasma de humanos fue de un absceso de una glándula de Bartholin (77) en 1937. Desde entonces, M. hominis ha demostrado ser habitante muy común de la membrana mucosa genitourinaria del hombre y se han hecho muchos intentos para determinar el potencial patogénico de estos organismos en relación con las enfermedades inflamatorias de los tractos genitales de los hombres y mujeres.

Todos los monos que se infectaron experimentalmente al ser inoculado M. hominis en sus trompas uterinas, presentaron una gran patología, así como una evidencia histológica de lesiones inflamatorias agudas de la parte superior del tracto-

genital. Todo el curso de la infección fué, en esencia, el mismo en todos los animales de experimentación, incluyendo al que recibió el inóculo de M. hominis en forma rápida. Clínicamente ninguno de los monos presentó ningún signo de enfermedad notable, su condición de salud general permaneció bastante bien.

Se presentaron prematuramente lesiones graves a los 3 días, e igualmente signos de una reacción inflamatoria aguda.

En forma característica, la parte lateral de las --- trompas uterinas estaba hinchada y enrojecida, mientras que en esta etapa, la parte media y el parametro se veían normalmente.

En el 7º día, las trompas mostraron una hinchazón pronunciada e hiperemia a lo largo de toda su longitud y el parametrio estaba pronunciadamente edematoso. Transcurridos 12 --- días, los signos de inflamación en las trompas disminuían, pero el parametrio todavía mostraba una marcada hinchazón. Durante las dos ó tres semanas siguientes hubo una regresión de las lesiones inflamatorias aún más notables y el tracto genital superior aparentemente estaba normal 4 ó 5 semanas después de la inoculación de Mycoplasma.

En ninguna etapa de la infección se observó un exudado de las trompas. El útero solo mostró signos leves de inflamación, y los ovarios invariablemente estuvieron normales sin edema ni enrojecimiento. No se desarrollaron estructuras císticas

cas ni en las trompas, ni en los ovarios o en el parametrio.

Microscópicamente se encontraron cambios inflamato-- rios notables en las trompas uterinas y parametrio de los cin-- co monos inoculados con M. hominis.

El lumen de las trompas siempre tenía una apariencia normal sin ninguna célula inflamada ni exudada.

En la mayoría de los casos, la infiltración celular-- se extendió hacia la capa lateral periférica de la capa muscu-- lar. Las lesiones inflamatorias del parametro se caracteriza-- ron por un edema marcado e hiperemia, acompañado de infiltracio-- nes celulares que principalmente consistían de un gran número - de linfocitos, pero también de algunos granulocitos heterofili-- cos. En la mayoría de los casos, se presentó necrosis de grasa.

No se observó ningún incremento significativo de la-- temperatura rectal en relación con la infección por *Mycoplasma*.

En número de leucocitos observó un ligero descenso - en el tercer día, seguido de un incremento moderado del 70. al-- 140. días. Las cuentas diferenciales no mostraron ningún cam-- bio consistente.

Aunque ningún mono tenía anticuerpos detectables en-- suero previamente a la inoculación, dichos anticuerpos se desa-- rrollaron en los días 7 al 12. En todos los monos se observó - un incremento cuádruple durante el curso de la infección con - un máximo de título de 160-640, los cuales se mantuvieron a es

te nivel por más de tres meses.

Inserción de M. synoviae en fibroblastos de pollo.

Para realizar este estudio se utilizaron técnicas de inmunofluorescencia y de transmisión de electrones para demostrar la inserción de M. synoviae a los fibroblastos del embrión de pollo. (2)

Aunque los microorganismos colonizaron la superficie de muchas células, hubo una notable variación en el número de microorganismos asociados con células individuales.

Como se hizo notar en un exámen hecho por Stanbridge (1) la adsorción de Mycoplasma a células fibroblásticas, epiteloides o linfocíticas, puede ocasionar una serie de efectos citotóxicos que a veces pueden llevar a la muerte celular.

M. Pneumoniae demostró haberse insertado a las células del revestimiento interior epitelial de los cultivos de órganos traqueales, inhibiendo el movimiento ciliar normal e induciendo la necrosis.

Cohen y Somerson (64) demostraron que M. pneumoniae produce grandes cantidades de peróxido de hidrógeno que lisa eritrocitos y sugieren que este peróxido puede provocarle una lesión extensa al epitelio respiratorio.

Otros científicos sugieren que lo que produce los cambios patológicos en el huésped eucariótico, es la misma in-

serción o la lixiviación de los nutrientes de la célula por la inserción de Mycoplasma. Un informe anterior mostró que M. synoviae, el cual es el agente que ocasiona la sinovitis del pollo, se inserta a los fibroblastos del embrión de pollo teniendo ~~com~~ vía un receptor sensible de neuraminidasa. Este estudio se llevó a cabo para demostrar esta inserción al utilizar inmunofluorescencia y microscopía de transmisión de electrones

La microscopía electrónica mostró en forma muy dramática la inserción de las cepas de M. synoviae a los fibroblastos de embrión de pollo. La distribución de los Mycoplasma en los diferentes fibroblastos aparentó ser bastante desigual.

Las partículas de Mycoplasma no se detectaron en ningún de los fibroblastos no infectados.

Al utilizar microscopía de transmisión de electrones, se observó que la inserción de Mycoplasma bovino a células Me- la aparentó ser similar a la de M. synoviae.

Tanto estudios actuales como anteriores, verifican-- que M. synoviae se inserta a la superficie de las células embrionarias de pollo. (2)

Todavía se tiene que determinar el papel que juega esta inserción en la citotoxicidad in vitro y en el daño celular in vivo. Aún no se sabe la razón de la distribución desigual de Mycoplasma en los diferentes fibroblastos celulares,-

pero podría reflejar una diferencia en la distribución de lugares receptores. Se deben relajar estudios adicionales para aclarar esta posibilidad, ya que se podría estar dando en los tropismos que se presentan con muchas infecciones por *Mycoplasma*.

*M. synoviae* presenta otros efectos sobre las funciones celulares de los mamíferos. Se ha dicho que es muy mitogénico para los linfocitos de ratón e inducirá a los linfocitos de humano cultivados a que produzcan un interferón.

Se requieren más estudios sobre el papel que juegan estas interacciones *Mycoplasma*-célula en la patogénesis de la enfermedad inducida por *M. synoviae*.

## CAPITULO III

## DIAGNOSTICO DE LABORATORIO.

1) BACTERIOLOGICO.

M. pneumoniae puede cultivarse a partir del esputo o de una muestra del exudado faríngeo tomada con un hisopo por siempre directa en medios líquidos o sólidos conteniendo suero y extracto de levadura, así como penicilina y acetato de talio, para inhibir el crecimiento de las bacterias contaminantes.

En el caldo aparecen, tras unas semanas o más de incubación, unas colonias libres, flotantes, esféricas, de 10 a 200 u de diámetro; se tifen intensamente con rojo neutro y pueden observarse con ayuda de una lupa o de un microscopio.

El tiempo medio de reproducción, aún de las cepas mejor adaptadas en medios líquidos, no es nunca inferior a las 6 horas.

Las colonias en agar se tifen habitualmente con azul de metileno y azur II, pero no son detectables hasta el 6º a 20 avo. día; miden 150 u y presentan una superficie con aspecto de mora sin halo periférico.

El organismo puede identificarse presuntivamente por su capacidad para producir hemadsorción o hemólisis total de los eritrocitos de cobayo y puede identificarse de modo defini

tivo por la tinción de sus colonias, mediante anticuerpos homólogos marcados con fluoresceína por demostración de la inhibición de su crecimiento por los anticuerpos no marcados en medio líquido conteniendo tetrazolio, este último se denomina prueba de inhibición de la reducción del tetrazolio (TRI). Como M. pneumoniae fermenta la glucosa, también puede utilizarse el rojo de fenol como indicador de crecimiento en medio líquido conteniendo glucosa al 1 %.

La respuesta de anticuerpos en la neumonía micoplásmica puede demostrarse por pruebas de fijación del complemento en suero de enfermos en fase y convaleciente.

Aunque la prueba de hemaglutinación indirecta es más sensible, no se utiliza como método corriente de diagnóstico, ya que pueden existir en el suero aún en fase aguda, títulos altos de IHA.

También pueden practicarse las pruebas para detectar las crioaglutininas frente a los eritrocitos humanos del grupo "O" y las aglutininas, frente al Streptococcus MG, aunque la ausencia de estos anticuerpos en el suero de convalecientes no excluye el diagnóstico de infección por M. pneumoniae.

#### A) TOMA DE LA MUESTRA.

Para cultivar el esputo, este debe ser recolectado en tubos de vidrio estériles o en recipientes de plástico, pe-

ro no se deben usar copas de papel.

El mayor problema confrontado por el diagnóstico de laboratorio, se considera que es respecto al cultivo del esputo debido a la negligencia o carencia con las cuales se tratan dichas muestras.

La muestra para el cultivo del esputo se necesita -- que sea de material purulento o mucopurulento y ésta debe ser obtenida con el paciente despierto si es posible.

Una tos profunda seguida de la espectoración, puede dar como resultado un material adecuado, durante el tiempo que el paciente segregue secreción bronquial.

Austrian (51) estableció inequívocamente que "la colecta del esputo del paciente con enfermedades del tracto respiratorio bajo, es propiamente la función del médico asistente

El esputo debe ser recogido antes de que empiece la terapia antimicrobiana.

La obtención del esputo por espectoración y también en una cierta extensión, por broncoscopia, por lo general siempre se contamina con organismos bucales o de secreciones faríngeas. Se recomienda lavar el esputo con salmuera para retirar el exceso de saliva, de cualquier forma, este es un procedimiento tedioso; además, el lavado no facilita la distinción -- del origen del esputo (del tracto respiratorio supralaringeal-

o intralaringeal).

Por esta razón se recomienda una tensión aumentada - de  $\text{CO}_2$  colocando la placa no cerrada en un recipiente anaero-- bio con una vela encendida dentro hasta que se cierre el reci-- piente; cuando se alcance una tensión apropiada de  $\text{CO}_2$  se apa-- gará la vela. Incubar las placas de 24 hrs. a 12 días, las -- muestras para M. pneumoniae (pero no para otras especies) pue-- den ser congeladas a  $-70^\circ\text{C}$ .

Para otros Mycoplasma diferentes de M. pneumoniae se usa medio básico sin acetato de talio y anfotericina, incubado en una atmósfera con 95 % de nitrógeno y 50 % de bióxido de -- carbono.

## B) MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS.

### a) DE TEJIDO MODIFICADO.

Se desarrolló un medio de cultivo conteniendo una ba-- se de tejidos químicamente definido para el cultivo de Myco--- plasma. Cuando se suplementa con albúmina, glucosa, suero y -- extracto de levadura, el nuevo medio soporta adecuadamente el-- crecimiento de las especies de Mycoplasma y Acholeplasma; los-- medios con alto contenido de proteínas son normalmente usados-- para la obtención de Mycoplasma. Sin embargo se han desarrolla-- do medios semidefinidos, los cuales producen suficientes Myco-- plasma que son obtenidos normalmente en medios complejos con -

una base de infusión ( corazón de buey ) y suplementos tales - como 20 % de suero de caballo 10 % de extracto fresco de levadura. La composición del medio es importante puesto que puede afectar directamente la fragilidad osmótica, la actividad de la nucleasa, la antigenicidad y la actividad peroxido-peroxidasa.

La complejidad y el alto contenido de proteína-lipoproteína de un medio estandar de Mycoplasma, frecuentemente -- causa precipitación no específica de algunos componentes del medio. Esta precipitación causa turbidez y puede contaminar -- los gránulos celulares con proteínas no celulares y lípidos.

#### b) PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACION.

Cuando el propósito es el aislamiento, se utiliza la base de agar de Mycoplasma con enriquecimiento de Mycoplasma o agar de Columbia con 10 % de suero de caballo, se incuba y se ven con baja potencia los microorganismos, suspendiéndolos en base de caldo de Mycoplasma con extracto de levadura y suero de equino y hemina. Se transfieren las colonias de microorganismos aisladas a placas para sensibilidad e identificación.

Las pruebas de identificación se realizan en una base de agar de Mycoplasma con enriquecimiento de Mycoplasma o agar de Columbia con 10 % de suero de caballo TC.

Incubar y examinar los microorganismos con objetivo-

de baja potencia.

Cuando el propósito son pruebas de sensibilidad, se utiliza base de agar de Mycoplasma con enriquecimiento para Mycoplasma o agar Columbia con 10 % de suero de caballo TC; se usan sensidiscos comerciales. Incubar y examinar los halos de inhibición que se presentan para dar la sensibilidad correspondiente a cada sensidisco.

Lipoproteínas como sustitutos de sueros en medios de cultivo para Mycoplasma.

Ultimamente se ha descubierto como sustituto del suero en medios de cultivo para Mycoplasma pneumoniae a la lipoproteína cruda que contiene fracciones de suero de tres diferentes especies de animales examinados en combinación con suero, con albúmina bovina.

Todo suero produce por lo menos una lipoproteína, -- que fue considerablemente más efectiva en provocar el crecimiento de Mycoplasma comparado con la muestra de suero no fraccionada de la cual se derivó.

La actividad muy lenta de ciertas muestras de suero íntegro probadas en la investigación, sugieren que las sustancias tóxicas pueden estar contenidas en éste, pero en cambio no están contenidas en las preparaciones de lipoproteínas.

La mayor actividad aparece con lipoproteínas de alta

densidad, componentes contenidos en el suero de caballos, y -- con las lipoproteínas de baja densidad, componentes contenidos en el suero humano.

El alto grado de actividad de crecimiento por causa de esta lipoproteína cruda conteniendo componentes del suero, sugirió que pueden ser usadas como sustitutos de suero en los medios de cultivo para *Mycoplasma*.

Sin embargo, la posibilidad de usar lipoproteínas de suero como sustituto de suero íntegro, no ha sido ampliamente explorada.

Recientemente Slutzky et. al. (68) reportaron que las lipoproteínas humanas, de alta y baja densidad, pueden actuar como donadores de colesterol para *M. hominis* y *M. laidlawii*.

#### c) OBSERVACION DE LAS COLONIAS.

Las colonias de *M. pneumoniae* son tan pequeñas que se deben observar con el aumento pequeño del microscopio, variando su diámetro de 10 a 200 micras.

La mayoría de las cepas provenientes de fuentes humanas o de otras especies animales, producen colonias homogéneamente granulares con aspecto de huevo frito puesto que el centro de las colonias generalmente crece hacia abajo o se recubre con el agar. *M. pneumoniae* raramente muestran esta característica. El tefido de Dienes se puede usar para ayudar a la dis--

tinción de las colonias de Mycoplasma de entre otras

Cuando una pequeña cantidad de este colorante se pone con un algodón cerca de una colonia sospechosa, se observa una difusión tiñéndose la colonia de azul si es Mycoplasma. Puede reconocerse con la morfología típica, descrita bajo propiedades morfológicas. Los organismos vivos decoloran en unos cuantos minutos. (93)

#### Descripción de los organismos individuales.

Se necesitan métodos especiales de tinción para distinguir las unidades individuales de M. pneumoniae, son pequeños, pleomórficos y su variabilidad de forma se debe a que no tienen las paredes rígidas. Son similares a las Formas L procedentes de los protoplastos. Cuando se observan con una lente de gran aumento, las colonias dan la impresión al observador de que está viendo un grupo de gotas de variados tamaños que han confluído en una sola masa, aunque conservando su individualidad dentro de la misma. Sin el uso de tinciones especiales como la de Dienes, no se pueden diferenciar los microorganismos de la colonia y, aún así, no ayuda mucho.

La microscopía electrónica es útil pero es una técnica difícil para los laboratorios de diagnóstico. Por tanto, es más satisfactorio trabajar con estos gérmenes en colonias.

Algunos investigadores afirman que los PPLO sufren --

cambios morfológicos progresivos que constituyen un ciclo vital regular.

d) TRANSFERENCIA DE CULTIVOS.

Cuando se llevan a placas de agar, las colonias no se deben tomar con el asa bacteriológica. En vez de esto se debe cortar un cubo de agar de 0.5 cm. que contenga las colonias con una espátula de acero inoxidable estéril levantar el bloque con ella y colocarla con el lado de la colonia hacia abajo en una placa con agar fresco. Entonces, empujar el cubo de agar sobre la placa para inocularla. Dejar el bloque en el medio después de la inoculación. Si no se desarrollan las colonias se las encontrará aún debajo del bloque de agar.

Las placas de cultivo deben cerrarse con parafina -- derretida estéril entre el lado de la placa y la tapa.

2) IMUNOLOGICO.

A) SEROLOGIA

Después de la neumonía atípica primaria, los pacientes pueden presentar un arreglo complementario de anticuerpos para un número de antígenos disimilares, aglutininas frente a microorganismos como *Etreptococcus* MG y aglutininas frías para células rojas humanas; son reacciones no específicas y son índices pobres de infección.

El incremento en el título de aglutininas frente a *Streptococcus MG* ocurre aproximadamente en un 25 % de los pacientes que tienen neumonía debido a *M. pneumoniae*.

Para aglutininas frías, la incidencia es cerca del 50 %, pero aproximadamente un 25 % de los pacientes con neumonía debido a otros agentes diferentes de *M. pneumoniae* pueden también revelar aglutininas frías.

De todas maneras, esto quiere decir que el grado de respuesta de las aglutininas frías en pacientes con *M. pneumoniae*, varía con la severidad de la enfermedad, aunque esa relación no se encuentra siempre.

En años recientes, se ha revelado un número de pruebas para la detección de anticuerpos específicos al *Mycoplasma* éstas se enlistan a continuación:

Inmunofluorescencia indirecta

Fijación de complemento

Hemaglutinación indirecta

Aglutinación en látex

Hemaglutinación acumulativa

Estas pruebas, que han sido evaluadas adecuadamente, detectarán el incremento en el título de anticuerpos en enfermos convalecientes, en aproximadamente el 80 % o más a partir de personas inoculadas con *M. pneumoniae*.

La máxima eficiencia del diagnóstico, requiere el --

uso de más de uno de los procedimientos serológicos, algunos - de los cuales parecen estar detectando diferentes tipos de anticuerpos .

La presencia de anticuerpos confiere protección contra enfermedades causadas por M. pneumoniae, pero puede ocurrir una reinfección remota.

Las pruebas apropiadas para un laboratorio estriban sobre el objetivo y calidad de la especialización.

La inmofluorescencia indirecta, también usada para la detección de anticuerpos contra M. pneumoniae, requiere pulmones de abriones de pollo congelados, complemento de cerdo de Guinea, suero de cabra antihumana y un microscopio fluorescente; la técnica es laboriosa y difícilmente adaptable a la rutina del diagnóstico de laboratorio, aunque es sumamente eficiente para el diagnóstico de enfermedades por M. pneumoniae.

Los reactivos para la prueba de fijación de complemento pueden ser comprados comercialmente y aquéllos para hemaglutinación indirecta o aglutinación en látex, pueden ser preparados con adelanto y almacenados; los procedimientos son comparables a aquél empleado rutinariamente en el diagnóstico serológico en los laboratorios, y las pruebas son adaptables para la detección de anticuerpos a varias especies de Mycoplasma

La hemaglutinación acumulativa para la detección de anticuerpos frente a M. pneumoniae no es bien evaluada y re---

quiere del uso de organismos vivos.

La prueba de inhibición metabólica para detección de anticuerpos frente a varios micoplasmas, requiere de un organismo vivo, medio PPLO y un período de incubación de varios días antes de que se alcance un resultado.

#### Identificación inmunológica.

Se ha desarrollado un método inmunológico satisfactorio para la selección de los PPLO. (15)

Se preparan discos múltiples con suero, mojando la punta de cada banda radial del disco en un suero diferente. Al macerar los discos a menos 70°C en envase estéril. Mediante este método, cuando se va a clasificar una cepa de PPLO, puede ser fácilmente identificada.

#### Prueba de Neutralización.

Se puede detectar el anticuerpo neutralizante al PPLO Eaton utilizando la rata algodonera como huésped.

#### B) IMUNOFLUORESCENCIA.

##### Prueba de anticuerpos fluorescentes:

Se puede detectar el anticuerpo específico en suero humano en un animal hiperinmune por esta técnica. Se pueden tratar los cortes de bronquio de embrión de pollo infectado con el suero a probar y más tarde con globulina gama antihumana marcada. Es una técnica embarazosa si se compara con la fi-

jación del complemento por microtitulación; por tanto, este último método está reemplazando al primero.

Se ha visto que el anticuerpo antiagente Eaton se desarrolla en la segunda y tercera semana de enfermedad y ocasionalmente persiste más de un año.

#### Identificación de colonias de Mycoplasma por Inmunofluorescencia .

Se han usado un gran número de técnicas para examinar colonias de Mycoplasma por inmunofluorescencia.

Por ejemplo, las colonias pueden ser teñidas in situ en el medio de agar y observadas por luz ultravioleta incidente.

Un camino para examinar colonias de Mycoplasma por inmunofluorescencia es la tinción de las colonias por impresión en un portaobjetos, los cuales pueden ser observados con luz incidente o transmitida.

La técnica de fijación con agua caliente es comúnmente usada para preparar impresiones; sin embargo, ha sido reportado el resultado en forma poco específica.

El método se lleva a cabo exponiendo a los organismos a una temperatura de 80 - 85°C y el calor puede dañar los antígenos sensibles. Este reporte describe un modo simple y rápido de preparación de impresiones de colonias en las cuales--

se usa un tapón de goma para transferir material antigénico directamente desde el agar al portaobjeto del microscopio. Se -- utiliza un tapón de goma (10 mm de diámetro), los tapones se -- lavan, se hierven en agua destilada y se seca al aire antes de usar, después de usarlos son remojados en un desinfectante iodofórmico antes de volverse a usar.

Para la transferencia de colonias, el botón del ta-- pón se aplica suavemente a las colonias seleccionadas y cuida-- dosamente se levantan e inmediatamente se aplican a un portaob-- jetos.

La aplicación de presión al tapón es innecesaria, -- aunque se vió que es posible hacer dos o tres impresiones con-- un tapón, por incremento gradual de presión para cada uno suce-- sivamente.

Las impresiones de colonias se fijan pasándolas a -- través de la flama por dos períodos de aproximadamente 0.5 se-- gundos, esta corta exposición al calor suave no parece dañar -- al antígeno.

Para inmunofluorescencia indirecta, colonias de M. - avian y de Acholeplasma laidlawii tuvieron poco crecimiento en agar para Mycoplasma conteniendo 15 % de suero de cerdo. (9)

### C) COMPLEMENTO.

Prueba de fijación del complemento.

Esta prueba se emplea para determinar la presencia - (o el título) de los anticuerpos fijadores del complemento. Dicha prueba depende del hecho de que los tipos adecuados de los anticuerpos, al combinarse con su antígeno, deben consumir el complemento. En esta forma al agregar una cantidad conocida -- del complemento a una mezcla de antígeno (el cual se prepara -- como se indica en el anexo A) con el suero que puede contener al anticuerpo correspondiente, es posible apreciar la existencia de una reacción, determinando la cantidad del complemento -- que se ha consumido o fijado en el transcurso de la reacción -- mencionada. Esto se logra agregando eritrocitos sensibilizados con hemolisina de oveja a la mezcla y dando tiempo para que -- ocurra la fijación del complemento en la reacción de antígeno-anticuerpo que se estudia.

En un estudio realizado acerca de los componentes -- del complemento ( $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$  y  $C_4$ ) en secreción bronquial des-- pués de la infección intranasal de cerdos de Guinea con M. --- pneumoniae y disociación específica e inespecífica de los meca-- nismos de defensa, se observó que, ciertamente después de la -- infección intranasal del animal con M. pneumoniae, los elemen-- tos del complemento aumentaron significativamente en secrecio-- nes bronquiales por la cantidad aumentada comparada con los -- elementos del grupo control, los signos histopatológicos de in

flamación no aparecieron en este tiempo. Dos semanas después, cuando los componentes del complemento en la secreción bronquial fueron bajos en comparación al nivel de control, el título de anticuerpos en el suero incrementó y subió a un nivel más alto 6 semanas después de la infección.

Por esta razón se pueden distinguir las dos fases de la reacción del microorganismo a la inoculación intranasal. El aumento de los componentes del complemento después de la infección puede representar un mecanismo de defensa inespecífico en el huésped antes de que la respuesta inmune específica comience a ser efectiva, ya que el sistema del complemento puede ser activado por M. pneumoniae por la vía clásica, este puede ser un cambio alternativo en la ausencia de anticuerpos.

Para aclarar el mecanismo patogénico de estos microorganismos, se usó el cerdo de Guinea en estos estudios porque se había demostrado previamente que estos animales son altamente sensibles a la infección por M. pneumoniae.

#### D) HEMOLISINAS.

Las colonias de *Mycoplasma* producen zonas de hemólisis total en un medio preparado con hematíes de cobayo.

Las pruebas para hemolisina pueden hacerse en placas de agar que contengan extracto de levadura, que hayan sido incubadas en acrobiosis y que tengan una densidad de colonias ba

ja (alrededor de 100 a menos por placa de 60 mm).

La preparación para la prueba se hace como sigue:

Lavar sangre de cobayo tres veces con solución de -- NaCl al 0.85 %. Añadir éstas en una concentración final del 4% a medio de agar Difco PPLO enfriado a 50°C.

Verter aproximadamente 3 cm. de esta mezcla en cajas de agar que contengan colonias de M. pneumoniae en crecimiento

Después, incubar las cajas a 36° C. durante un periodo de 4 a 12 días.

Observar las cajas diariamente en busca de la hemólisis que puede verse desde el primer día hasta el décimo segundo. Otras especies de PPLO producen una hemólisis parcial - - cuando se prueba por el mismo método.

## E) HEMAGLUTINACION

### CRIOAGLUTININAS.

El suero de la mayoría de los individuos con neumonía atípica primaria en la etapa de convalecencia, contiene un componente semejante a los anticuerpos que produce la aglutinación de los eritrocitos humanos del grupo O a temperaturas entre 0 y 5°C, que se ha denominado "aglutininas en frío o crioaglutininas. La aglutinación es reversible puesto que los eritrocitos agrupados por las crioaglutininas se dispersan cuando se calientan a 37°C. Este es un buen método para detectar una

aglutinación en frío auténtica.

Los títulos encontrados al 1/32 ó mayores se consideraran como elevados.

Generalmente las aglutininas empiezan a aparecer al final de la primera semana o durante la segunda, disminuyendo entre la cuarta y la sexta semana.

La hemaglutinación para la detección de anticuerpos frente a *M. pneumoniae* requiere del uso de organismos vivos.

#### F) IDENTIFICACION POR INHIBICION DEL CRECIMIENTO

Para la identificación de *Mycoplasma* por inhibición del crecimiento se debe preparar discos de papel filtro estériles impregnados con suero.

Una vez que el disco ha sido impregnado con suero, pueden ser almacenados a 20°C, secando los discos impregnados con suero antes del almacenaje no se reduce la efectividad.

Secar una placa de agar para *Mycoplasma* en una incubadora a 37°C con la parte superior entreabierta durante 20 a 60 minutos e inocular con 0.1 ml del caldo de cultivo conteniendo el microorganismo prueba por un período de dos a tres días.

Extender el inóculo uniformemente con una varilla de vidrio y secar la placa en la incubadora hasta que no escurra el fluido cuando se sostenga la placa en posición inclinada.

Presionar el disco impregnado de suero sobre la superficie de agar inoculado e incubar las placas hasta que pueda ser observada microscópicamente la zona de inhibición alrededor del disco conteniendo suero específico contra el microorganismo a prueba.

El aumento de la potencia del suero y el tamaño del inóculo pueden influir en el tamaño o de la zona de inhibición, un inóculo de 1,000 a 10,000 colonias por placa es óptimo, uno más pequeño dá colonias insuficientes para la interpretación.

El espesor del agar no influye sobre los resultados, pero las aplicaciones del disco por más tiempo que ocho horas, después de la inoculación de la placa, pueden reducir la zona de inhibición.

## CAPITULO IV

### 1) PROFILAXIS.

La mayor parte de las neumonías micoplásmicas a menudo son endémicas, su frecuencia es muy variable, aumentando durante los meses de invierno. Sólo una fracción pequeña (probablemente menos del 5%) de los individuos infectados por M. pneumoniae desarrollan neumonía; la mayoría presta solo síntomas en las vías respiratorias altas, y en otros no se observa ningún tipo de enfermedad. El período de incubación a juzgar por los experimentos realizados (24) con voluntarios humanos es de 9 a 12 días. Se sabe que los individuos infectados albergan el organismo en las vías respiratorias durante cuatro semanas como mínimo, a pesar de la existencia de títulos altos de anticuerpos protectores en su suero. No se sabe sin embargo, durante cuánto tiempo conservan su capacidad infectiva. La enfermedad se transmite probablemente a través de gotitas contaminadas de las vías respiratorias.

Las medidas de aislamiento están indicadas sólo durante las epidemias, no se dispone de una vacuna aún para su prevención.

### 2) TRATAMIENTO

A causa de la falta de pruebas diagnósticas especí-

ficas, las primeras pruebas sobre la actividad de las tetraciclinas, en el tratamiento de la neumonía atípica primaria fueron difíciles de interpretar, lo cual condujo probablemente a la inclusión de muchos pacientes cuya enfermedad no era producido por *M. pneumoniae*. Sin embargo, en 1961 se realizó un estudio doble sobre 109 pacientes diagnosticados serológicamente de neumonía micoplásmica. La administración de dimetilclorotetraciclina durante 6 días redujo de modo significativo la duración de la fiebre, así como otros signos y síntomas, en comparación con el curso de la enfermedad en pacientes que recibían placebos.

A pesar de haber probado la eficacia de las tetraciclinas, es difícil aún el tratamiento de los pacientes afectados de neumonía atípica primaria.

Como las pruebas diagnosticas disponibles requieren habitualmente de largos períodos para realizarlas, la decisión respecto al comienzo de la terapia debe hacerse con relación a datos clínicos y epidemiológicos. Se debe tener mucho cuidado en excluir otras enfermedades micóticas o bacterianas que deben tratarse con otros medicamentos.

Cuando se dispone de la posibilidad de teñir *M. pneumoniae* en el esputo, por medio de anticuerpos fluorescentes, puede hacerse con mayor precisión el tratamiento de la neumonía atípica primaria.

La kanamicina es también eficaz en las infecciones experimentales, pero no se utiliza de modo habitual en el tratamiento de esta enfermedad en el hombre.

Ultimamente se ha demostrado la gran eficacia de la doxiciclina, derivado de la tetraciclina, por su gran poder bactericida su gran índice de absorción digestiva y la permanencia de niveles terapéuticos en sangre durante tiempo prolongado, tras la administración de una sola dosis.

Dosis actualmente usadas:

Tetraciclinas o equivalentes: 0.25g c/6 hrs.

Eritromicina: 0.5g/8 hrs.

Doxiciclina parece ser suficiente 200 mg el primer día y 100 -  
mg los siguientes.

Se ha visto que a las 24-48 hrs. generalmente acostumbra desaparecer la fiebre, aunque los síntomas respiratorios - pueden permanecer por 6-7 días, por lo cual se aconseja que el tratamiento se prolongue por dos o tres semanas; no obstante, - se ha podido comprobar que en numerosos casos existe persistencia de M. pneumoniae en el árbol respiratorio durante algunos-  
meses, sin que se hallan encontrado recidivas.

## CAPITULO V

### DISCUSION.

La patología clínica demuestra gran interés médico por el desarrollo de las diferentes especies de *Mycoplasma* que causan enfermedad en el hombre, sobre todo en las vías respiratorias (*M. pneumoniae*, *M. orale* y *M. salivarium*) y en las vías urogenitales (*M. fermentans* y *M. hominis*), así como en los animales produciendo enfermedades tales como la pleuropneumonia bovina (*M. mycoides*), agalactia de los cerdos y las cabras (*M. agalactiae*), la poliartritis de las ratas (*M. arthritidis*) y una enfermedad neurológica atóxica en los ratones (*M. neurolyticum*) las cuales son consideradas como las más importantes.

Debido a las complicaciones respiratorias que presenta en el humano *M. pneumoniae*, se hace necesario realizar el diagnóstico en el laboratorio con medios básicos de cultivos que contengan azul de metileno, por su capacidad de reducirlo, agregándole rojo de fenol, por lo que el crecimiento se ve indicado por el virre de color de morado a amarillo, siendo este un método sencillo para investigar la presencia de *M. pneumoniae*.

Otras complicaciones que van estrechamente ligadas a síntomas respiratorios como miocarditis y/o pericarditis-

diagnosticada clínicamente o electrocardiográficamente, pueden ir asociadas a las pancreatitis agudas secundarias, o a infecciones por Mycoplasma.

En lo referente al mecanismo de acción de M. pneumoniae, parece ser que tiene un alto poder de producción de peróxido de hidrógeno y éste actúa como una hemolisina, siendo -- ejemplo único de ello, ya que las demás hemolisinas conocidas, producidas por microorganismos, son proteínas.

M. pneumoniae difiere antigénicamente de otras variedades de Mycoplasma humanos conocidas, crece más lentamente -- que muchas de éstas y a diferencia de la mayor parte de las especies de Mycoplasma fermentan la glucosa.

M. Hominis, habitante común de la mucosa del tracto genitourinario en humanos y animales, produce lesiones inflamatorias de las trompas y el parametrio, microscópicamente se encuentran en infiltraciones celulares en linfocitos y algunos-leucocitos polimorfonucleares en una fase aguda.

A menudo la enfermedad es endémica, su frecuencia es muy variable, aumenta durante los meses de invierno y se presenta en áreas densamente pobladas, al igual que las epidemias, - las cuales han alcanzado un 42% en 1966 y un 50% en 1974. Las tasas más altas han sido en niños escolares, así como también-fueron más altas en el género masculino que en el femenino.

De acuerdo al grado de investigación que se desee realizar, creo, a mi juicio, que los métodos descritos son adecuados y pueden aplicarse en cualquier laboratorio de análisis clínicos como un método de rutina, sin que se considere difícil su elaboración para que de esta manera se diagnostiquen oportunamente y se dé el tratamiento adecuado.

### ANEXOS.

A). Medios de cultivo, componentes y preparación.

#### Base de Agar de Columbia.

Fórmula en gramos por litro de agua destilada.

Peptona polypeptone .....	10.0
Peptona Biosate .....	10.0
Peptona Myosate .....	3.0
Almidón de Maíz .....	1.0
NaCl .....	5.0
Agar (desecado) .....	13.5

pH final 7.3

Preparación:

Hacer una suspensión con 42.5 gramos del material en un litro de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto.

Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C, durante 15 minutos. La base puede emplearse para preparar otros me-

dios.

Base de Agar para Mycoplasma. (Base de agar PPLO)

Fórmula en gramos por litro de agua destilada.

Infusión de corazón de res sobre la base de tejido fresco.

Peptona Biosate .....	10.0
Cloruro de sodio .....	5.0
Agar .....	14.0

pH final 7.8

Preparación:

Hacer una suspensión con 34 gramos del material seco en un litro de agua destilada. Mezclar totalmente.

Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Distribuir en alícuotas de 70 a 75 ml y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 50°C, agregando el enriquecimiento esterilizado deseado y vertir en las cajas.

En estudios más recientes se ha demostrado el valor de los extractos de levadura y del suero de caballo no calentado para el cultivo de Mycoplasma. Para preparar un medio no selectivo, pueden combinarse 20 ml. de suero de caballo y 5 ml. de extracto de levadura especialmente preparado, con 75 ml. de base de agar para Mycoplasma enfriado, esterilizarlo y verter en placas.

Base de caldo para Mycoplasma con cristal violeta.

La base de caldo para Mycoplasma con cristal violeta 0.01 gramos por litro de medio, se prepara de acuerdo a la fórmula original de Morton y cols. (75)

Base de caldo para Mycoplasma (sin cristal violeta).

Se recomienda para el aislamiento y cultivo de especies de Mycoplasma el uso de la base de caldo para Mycoplasma-debidamente enriquecida.

Para suprimir el desarrollo de contaminantes, pueden utilizarse 1,000 unidades de penicilina G por ml. y acetato de talio a una concentración final de 1:2000. Debe añadirse un -- 20 % de suero de caballo o de otro enriquecimiento.

La base de caldo para Mycoplasma se preparan de --- acuerdo a la fórmula de Morton para el caldo de enriquecimiento, pero sin cristal violeta.

Fórmula en gramos por litro de agua destilada.

Infusión de corazón de res .....	252.0
Peptona Biosate .....	10.0
Cloruro de sodio .....	5.0

pH final 7.8

**Preparación:**

Disolver 21 gramos del material deshidratado en un - litro de agua destilada, distribuyendo porciones de 70 ml. o - en otras alícuotas deseadas. Esterilizar en autoclave a 121°C

durante 15 minutos. Enfriar a menos de 50°C y agregar 20 ml. - de suero de caballo y 5 ml de extracto de hemina y levadura -- BBL.

También puede agregarse 30 ml. de enriquecimiento pa- ra Mycoplasma que contiene penicilina y acetato de talio, lo-- grandando la inhibición selectiva, así como suero de caballo y ex- tracto de levadura.

#### Usos:

El caldo para Mycoplasma adecuadamente enriquecido - puede emplearse para la propagación de grandes familias y para ayudar en el aislamiento de especímenes clínicos.

El material sospechoso o bloques de cultivo de agar- pueden introducirse en el caldo.

Después de incubarse desde 12 hrs. hasta 5 días, de- pendiendo de la cepa, se extiende una gota o el contenido de - una asa de la preparación uniformemente sobre la superficie de una placa reciente de agar para Mycoplasma, ya que el desarro- llo visible de estos microorganismos no se presenta de ordina- rio en caldo.

#### Enriquecimiento para Mycoplasma.

El enriquecimiento para Mycoplasma es una mezcla liq- uida de ingredientes usados como suplemento en medios ade- cuados, cuando se desea el aislamiento selectivo de especies -

de Mycoplasma incluyendo M. pneumoniae.

Fórmula x 30 ml.

Suero de caballo ..... 20 ml.

Extracto de levadura ..... 10 ml.

(recién autorizado)

Penicilina G ..... 50,000 U

Acetato de talio ..... 50 mg.

Preparación:

Reconstituir el contenido de cada frasco agregando --  
asépticamente 30 ml. de agua destilada esterilizada.

Agregar 30 ml. de enriquecimiento reconstituido a ---  
70 ml. de base de agar para Mycoplasma BBL 11455 fundido y este  
rilizado a unos 50°C ó a 70 ml. de base de caldo para Mycoplas-  
ma BBL 11457. Distribuir en envases estériles adecuados.

Usos.

Cuando se utiliza un agar o caldo para Mycoplasma, el  
enriquecimiento refuerza el desarrollo de Mycoplasma e inhibe -  
otras bacterias en cultivos mezclados.

La conservación de microorganismos puede tener lugar-  
en medios sin inhibidores.

Para este fin pueden utilizarse medios para Mycoplas-  
ma, enriquecidos con extracto de levadura al 5 % preparado espe-  
cialmente y suero de caballo al 20 %.

Medios básicos para el cultivo de Mycoplasma:

Medios de crecimiento en caldo.

Caldo Difco PPLO .....	70 %
Suero de caballo .....	20 %
Extracto acuoso de levadura al 25 % .....	10 %
Penicilina .....	1,000 U/ml
Acetato de talio	
(inhibidor para género T) .....	0.5 mg/ml
Anfotericina B .....	5.0 ug/ml
Ajustar el pH a 8.	

Se puede agregar Rojo de fenol (0.002 %) y

azul de metileno para hacer más selectivo el medio.

Filtrar a través de papel filtro estéril.

Medio de crecimiento en agar.

Agar Difco PPLO .....

70 %

Esterilizar durante 15 minutos a 15 lb. de presión.

Enfriar a 45°C, entonces añadir.

Extracto de levadura al 25 % .....

10 %

Suero inactivado agamaglobulinémico

de caballo .....

20 %

entonces añadir:

Penicilina .....

500 u.i/ml

Anfotericina B .....

5 ug/ml

Acetato de talio .....

1/2.000

Concentración final .....

(0.5 g/l)

Verter de 6 a 7 ml. del medio de agar derretido, para cada caja de petri de 5 cm. de diámetro. Enfriar hasta que se endurezca.

El medio defásico Difco PPLO, sin cristal violeta --- puede ser preparado o elaborado por el laboratorio y distribuído en alícuotas apropiadas, esterilizado y almacenado a 4-5°C - para que se use en los meses siguientes, el agar puede ser disuelto en agua hirviendo y enfriado a 50°C para la preparación final del medio.

El suero de caballo puede ser almacenado por meses a 4 - 5°C.

El extracto acuoso de levadura es preparado como sigue: a) adicionando una parte de levadura activa seca (hornada) en cuatro partes de agua destilada.

b) calentando a ebullición.

c) filtrando por gravedad a través de dos discos de papel de medio poroso ( se usan diferentes capas a causa de la lentitud del procedimiento ).

d) ajustar el pH a 8.0 con hidróxido de sodio y esterilizar después de la distribución en alícuotas apropiadas.

Algunos Mycoplasma pueden ser recuperados usando suero de caballo al 10 % y 10 mg/ml. de autolizado de levadura; pero tal medio no es apropiado para la recuperación de M. pneumoniae.

El rojo de cresol alcalino (0.0004 %) ha sido recomendado como un indicador en el medio para el crecimiento de M. pneumoniae reemplazando al rojo de fenol; el indicador anterior cambia de amarillo a rojo a pH 7.2 antes, el medio era lo suficientemente ácido como para reducir la viabilidad.

El suplemento para cajas de agar y caldo para Mycoplasma, listo para usarse, puede ser esterilizado y almacenado a 4 - 5°C por algunos días. Un almacenaje prolongado puede incrementar el número de artefactos y reducir el rendimiento de organismos. El medio difásico (caldo cubriendo agar) y una agitación, mejoran el crecimiento.

Todos los Mycoplasma de origen humano crecen bien con incubación en anaerobiosis (nitrógeno con 5 al 10 % de dióxido de carbono), pero algunas especies, particularmente M. pneumoniae, también crecen en aerobiosis.

#### B) Prueba de fijación del complemento.

Preparación del antígeno: Preparar 100 ml. Inocular 4 ó 5 frascos de 250 ml. de caldo Difco PPLO con la técnica del bloque de agar. Incubar a 36°C durante 4 días. Recoger el crecimiento centrifugando el caldo a 18,000 r.p.m. durante una hora, en tubos de centrifuga de 50 ml.

Decantar el líquido dejando de 1 a 2 ml. del fondo de cada tubo.

Resuspender esta porción en solución salina amortiguadora de veronal a 1/50 de su volumen original.

Solución A:

Acido dietilbarbiturico ..... 4.6 gr

CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O ..... 0.2 gr

MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O ..... 1.0 gr

Disolver en 500 ml. de agua destilada a 90°C. Enfriar antes de mezclar con la solución B.

Solución B:

NaCl ..... 83.8 gr

NaHCO<sub>3</sub> ..... 2.52 gr

Dietilbarbiturato de sodio ..... 3.00 gr

Disolver en 500 ml. de agua destilada. Mezclar las soluciones A y B y diluir a dos litros. Ajustar el pH de 7.3 a 7.5.

Al añadir la solución amortiguadora, si el volumen original de caldo del que se ha derivado el centrifugado era un litro, se debe resuspender sólo en 20 ml. de solución amortiguadora (1/50 de vol. primitivo). Añadir fenol licuado (0.5 ml por 100 ml. del amortiguador) como conservador.

Antes de probar el antígeno se debe dejar reposar durante dos a tres semanas a 37°C o en agua hirviendo durante 30 minutos.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aldridge, K.E.  
1975. Growth and cytopathology of Mycoplasma synoviae in embryo cell cultures.  
Infecto. Immun. 12: 198-204.
- 2.- Aldridge, K.E. and B.C. Cole  
Immunofluorescence and electron microscopy of the attachment of Mycoplasma synoviae to chicken embryofibroblast.  
Infection and Immunity July 1978. pags. 328-332 vol. 21 --- No. 1.
- 3.- Allen Z. Peter and B. Prescott  
Immunochemical studies on a Mycoplasma pneumoniae polysaccharide fractions: cross-reactions with type 23 32 antineumococcal rabbit sera.  
Infection and Immunity. May 1978, 421-429. vol. 20 No. 2.
- 4.- Arva P. et. al.  
Hemolytic anemia caused by Mycoplasma pneumoniae infection.  
99 (13): page. 633-640, 10 May 1979 (Eng. abstr.)
- 5.- Bartolomew, L.E.  
Isolation and characterization of Mycoplasma from patients with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and Reiter's S. Arthr. Rheum. 8,376,1965.
- 6.- Biberfeld, G. 1977.  
Activation of human lymphocyte subpopulations by Mycoplasma pneumoniae. Scand. J. Immunol. 6:1145-1150.
- 7.- Biberfeld, G. 1971.  
Antibodies to brain and other tissues in cases of Mycoplasma pneumoniae infection. Clin. Exp. Immunol. 8: 319-333.
- 8.- Biberfeld, G., G.A., Sterner.  
Study of Mycoplasma pneumoniae infections in families.  
Scand. J. Infect. Dis. 1:39-46, 1969.

- 9.- Bradbury Janet M. A. C. Oriel, F. T. W. Jordan.  
Simple method for immunofluorescent identification of Mycoplasma colonies.  
Journal of clinical microbiology. Apr. 1976, p.449-452.  
Vol. 3 No. 4
- 10.- Bredt, W. B. Wellek, H. Bruner, and M. loos 1977.  
Interactions between Mycoplasma pneumoniae and the first -  
component of complement.  
Infect. Immunol. 15: 7-12.
- 11.- Bruner, H. 1974  
Studies on the pathogenesis of experimental Mycoplasma ---  
pneumoniae infection in the guinea pig. Med. 33: 411-420.
- 12.- Bruner H., R. L. Horswood, Chanock, R. M. More.  
Sensitive methods for detection of antibody to Mycoplasma  
pneumoniae. J. Infect. Dis. 127 (Suppl.): 852-855. 1973.
- 13.- Burdon L. Kenneth  
Microbiologia  
p. 269-275-1971.
- 14.- Burrows, William.  
Tratado de Microbiologia.  
p. 196, 525-529.  
Ed. Interamericana 1974.
- 15.- Calero Juan del Rey.  
Microbiologia e Inmunobiologia de las enfermedades infeccio  
sas.
- 16.- Cherry, J.D., and D. Taylor-Robinson 1973.  
Mycoplasma pathogenicity studies in organ cultures.  
Ann. NY. Acad. Sci. 225: 290-303.
- 17.- Chandler, R. W., H. Robinson and A. T. Masi.  
Serological investigations for evidence of an infections -  
etiology of rheumatoid arthritis.  
Ann. Rheum. Dis, 30, 274, 1971.

- 18.- Cole, B.C., J.R. Ward, L. Golightly, Rowland, and C. E. --  
Graham. 1970.  
Characterization of Mycoplasmas isolated from the great ---  
apes. J. Microbiol. 16: 1331-1339.
- 19.- Coll. J. et. al.  
Pneumonias caused by Mycoplasma pneumoniae.  
Rev. clinica española 147(2): 137-141  
31 oct. 1977 (Eng. Abstr.)
- 20.- Coll, J., J. García y A. Bal  
El Mycoplasma en la etiología humana.  
Rev. clinica española. Tomo 147, No.2 1977 p. 117-125.
- 21.- Collier, A. M., and W. A. Clyde jr. 1971.  
Relationships between Mycoplasma pneumoniae and human res-  
piratory epithelium.  
Infect. Immun. 3: 694-701.
- 22.- Crawford, Y. E.  
Isolation and identification of Mycoplasma in the clinical  
laboratory.  
medical reserch Unit. No. 4, U.S. Naval Hospital, 1964.  
Illinois, U.S. Naval.
- 23.- Csonka, G. W.; Williams. R. E. O., y J. Corse.  
T-Strain Mycoplasmas in non Gonococcal urethritis.  
Lancet, 1, 1292, 1966.
- 24.- Davis R. D., H. N. Ginsberg, W. B. Wood.  
Tratado de Microbiología.  
Editorial SALVAT 1976. p. 917-928.
- 25.- Dienes L., and S. Madoff.  
Development and growth of L forms of bacteria and PPLO on-  
membrane filters.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121:334, 1966.

- 26.- Dienes L., M.W. Ropes. W. E. Smith, S. Madoff and W. Bayer.  
The role of pleuropneumonia like organisms in genitourinary and joint diseases.  
N. Engl. J. Med. 238: 509-515/563-567.
- 27.- Domermuth, C.H.; N.H. Nielson, E.A. Freundt, C.H. Bir, A.-Anderson.  
Ultrastructure of Mycoplasma species.  
J. Bact. 88: 727 (1964).
- 28.- Dowdle, W.R., Stewart, J.A. Heyward, J.T. Robinson.  
Mycoplasma pneumoniae infections in a childrens populations a five year study.  
Am. J. Epidemiol. 85: 137-146, 1967.
- 29.- Eaton, M.D.  
Pleuropneumonia like organisms and related forms.  
Ann. Rev. Microbiol., 19: 379, 1965.
30. Estevens, A.M., F. C. Johnson.  
A new eruptive fever asociated with stomatitis and ophtalmia.  
Report of two cases in children.  
Amer. J. Dis. Child., 24, 526, 1922.
- 31.- Evatt, B. L.; W. R. Dowdle, M. Johnson, C. W. Heath.  
Epidemic Mycoplasma pneumoniae.  
New. Eng. J. Med. 285. 7, 374, 1971.
- 32.- Fenske D. and G. Kenny.  
Role of arginine deaminase in growth of Mycoplasma hominis  
Journal of Bacteriology.  
Apr. 1976, p: 501-510. vol. 126.No. 1
- 33.- Fernald, G.W. 1972.  
In vitro response of human lymphocytes to Mycoplasma pneumoniae.  
Infect. Immunn. 5: 552-558.

- 34.- Fernald G. W., A. M. Collier, W. A. Clyde.  
Respiratory infections due to Mycoplasma pneumoniae in ---  
infants and children.  
Pediatrics 55: 327-335, 1975.
35. Fiala, M.; B. A. Myhre,; L. T. Chinh., M. Territo; T. S. -  
Edginton y H. Kattlove.  
Pathogenesis of anemia associated to Mycoplasma pneumoniae.  
Acta Hematol., 51, 297, 1974.
- 36.- Fogh, J. and H. Fog.  
A method for direct demonstration of pleuropneumonias like-  
organisms in cultured cells.  
Proc. soc. exp. Biol. Med. 121: 334, 1966.
- 37.- Ford D. K. 1967.  
Relationships between Mycoplasma and the etiology of non -  
gonococcal urethritis and Reiter's Syndrome.  
Ann. N. Y. Acad. Sci.; 143: 501-504.
- 38.- Foy H. M. et. al.  
Long-term epidemiology of infections with Mycoplasma pneu-  
monias.  
The journal of Infections Diseases.  
139 (6), 681-687, Jun. 1979.
- 39.- Foy, H. M., G. E. Kenny, R. Macmahan, G. Kaiser, J.T. Gray  
son.  
Mycoplasma pneumoniae infections in families.  
J. Infect. Diseases. 1: 39-46, 1969.
40. Foy, H. M., J. Loop., E. R. Clarke; A. W. Mansy; W. E.  
Spence; P. Feipl, y S. T. Grayston.  
Radiographic study of Mycoplasma pneumoniae pneumonia.  
Amer. Rev. Respir Diss. 108, 469, 1973.
- 41.- Foy, H. M.; J. T. Grayston, G. F. Kenny, E. A. Russell y -  
Macmahan.  
Epidemiology of Mycoplasma pneumonias infection in fami---  
lies J. Amer. Med. Ass. 197, 11, 859, 1966.

- 42.- Fraser, R.G., y J. A. P. Pare.  
Diagnóstico de las enfermedades del tórax.  
SALVAT editores, S.A., 1973.
- 43.- Freundt, E. A. 1974.  
Present status of the medical importance of Mycoplasma.  
Pathol. Microbiol. 40: 155-187.
- 44.- Freeman R., and M. J. McMahon.  
Acute pancreatitis and serological evidence of infection -  
with Mycoplasma pneumoniae.  
Gut., 978, 19, 367-370.
- 45.- Frobisher M., Sc. D.  
Microbiología.  
SALVAT editores, S. A.  
Barcelona Madrid 1969
- 46.- Furness, G. 1973.  
T-Mycoplasmas: some factors affecting their growth, colo--  
nial morphology, and assay on agar.  
J. Infect. Dis. 128: 703-709.
- 47.- Gabridge G. Michael et. al.  
Ciliated respiratory epithelial monolayers:  
new model for Mycoplasma pneumoniae infection.  
Infection and Immunity p. 333-336 vol. 21 No. 1
- 48.- Gabridge G. Michael, E. Singer, and E. A. Rick.  
Cultivation of Mycoplasma in a modified tissue culture ---  
medium.  
Applied and Environmental microbiology.  
June 1976. p. 986-989 vol. 31, No. 6
- 49.- Ginsburg, H. and J. Nicoler, 1973.  
Extensive transformation of lymphocytes by a Mycoplasma --  
organisms.  
Nature (London) New Biol. 246:143 146.

- 50.- Graboqski, W. Marion, S. H. Lomo Rottem and F. M. Barile.  
Cholesterol requeriment of Mycoplasma as datermined by a-  
microtiter test using polyene antibiotitcs.  
Journal of clinical microbiology.  
vol. 3 No. 2 Feb. 1976. p. 110-112.
- 51.- Gradwohls  
Clinical laboratory methods and diagnosis.  
Seventh Edition. Saint Louis. The C.V. Mosby Company 1970,  
p. 1383-1390, 1108,1607, 1500, 1143, 1024.
- 52.- Grayston, J.T., E.R. Alexander; G. E. Kenny, E. R. Clarke.  
J. C. Fremont, y Mac Coll.  
Mycoplasma pneumoniae infections. Clinical and epidemiology  
studies.  
J. Amer. Med. Ass., 197, 369, 1965.
- 53.- Grayston, J.T., H.M. Foy, G.E. Kenny.  
The epidemiology of Mycoplasma infections of the human res-  
piratory tract. In L. Hayflick Appleton Century Crofts, New  
York, 1969, p. 651-682.
- 54.- Griffin, J.P. y Y.E. Crawford.  
Mycoplasma pneumoniae in primary atypical pneumoniae.  
J. Amer. Med. Ass., 193, 1011, 1965.
- 55.- Gronowicz, E., and H. Continho. 1974  
Selective triggering of B cell subpopulations by mitogens.  
J. Immunol. 4: 771-776.
- 56.- Gannel B., and Ethelmilsons.  
Mitogenicity of Mycoplasma fermentans for human lymphocytes.  
Infect. and Immunity july 1978.  
p. 48-54 vol. 21 No. 1.
- 57.- Hayflick L., 1965.  
Tissue cultures and Mycoplasma.  
Tex. Rep. Biol. Med. 23 (suppl. 1) p. 285-303.

- 58.- Hayflick, L. and R.M. Chanock. 1965.  
Mycoplasma species of man.  
Bacteriol. Rev. 29:185-221
- 59.- Hers J.P.F.  
Clinical aspects of infection with Mycoplasma pneumoniae.  
Proc. Roy. Soc. Med. 61, 1325, 1968.
- 60.- Hofstetter A.  
Mycoplasmas in inflammatory diseases of urogenital tract.  
Infection, and Immunity 1, 247, 1973.
- 61.- Houghes, J.H., D.C. Thomas, V.V. Hamparian, and W.L. Somerson, 1973.  
Characterization of Mycoplasma pneumoniae growth factors-  
in bovine serum fraction.  
J. Med. Microbiol. 7: 35-40.
- 62.- Janson, E.; G.R. Wallgreen, R. Wegeliur y W. Tuuri  
Mycoplasmas in juvenile rheumatoid arthritis.  
Acta Rheum. Scand. 17. 268, 1971.
- 63.- Jones, D.M.  
Mycoplasma hominis in pregnancy  
J. Clin. Pathol., 20, 633, 1967.
- 64.- Kenny, G.E., J.T. Grauston.  
Eaton pleuropneumonia like organisms (Mycoplasma pneumoniae)  
Complement. Fixing antigens.  
J. Immunol., 95, 19, 1965.
- 65.- Kim, K.S., W.A. Clyde jr. and F.W. Benny.  
Physical properties of human Mycoplasma species  
J. Bact., 92: 214, 1967.
- 66.- Klieneberger-Nobel  
Pleuropneumonia like organisms (PPLO), Mycoplasmataceae.  
Academic. Press, New York, 1962.

- 67.- Kundsín, R.B., T. Rowell, M.C. Shepard, A. Parreno, and --  
C.D. Luncford. 1975.  
T. strain Mycoplasma and reproductive failure in monkeys.  
Lab. anim. Sci. 25: 221-224.
- 68.- Leinghrice Wasburn and L. Norman.  
Lipoproteins as substitutes for serum in Mycoplasma culture  
medium.  
J. C. M.  
Oct. 1979 p. 586-589. vol. 10 No. 4.
- 69.- Lina K.L.  
Mucocutaneous reactions during Mycoplasma pneumoniae infections. (8065): 655, 25 de marzo 1978.
- 70.- Liu, C.  
Stúdie on primary atypical pneumonia. I Localization, isolation and cultivation of a virus in chick embryo.  
J. exp. med. 106:455 (1957).
- 71.- Loos, M. and B. Helmut  
Complement components ( $C_1, C_2, C_3, C_4$ ) in bronchial secretions after intranasal infection of Guinea pigs with Mycoplasma pneumoniae; Disociation of unespecific and specifec defense mechanisms.  
Infection and Immunity. Aug. 1979 p. 583-585.  
vol. 25 No. 2.
- 72.- Lovine E., A.A. Selva.  
El laboratorio en la clínica.  
Editorial médica panamericana. 1975.  
p. 559, 642.
- 73.- Lyell, A.; A.M. Gordon, H.M. Dick, R.C. Somerville.  
Mycoplasma and erythema multiforme.  
Lancet, 2, 116, 1967.
- 74.- Lynch J.M., et. al.  
Métodos de laboratorio.  
segunda edición 1972  
Ed. Interamericana. pags. 975-976.

- 75.- Madoff, S. 1960.  
Isolation and identification of PPLO  
Ann. NY. Acad. Sci. 79: 383-392.
- 76.- Merdh, P.A., F.S. Nilsson, and A. Byolle. 1973  
Mycoplasma and bacterialia synovial fluid from patients with  
arthritis.  
Am. Rheum. Dis. 32:319-325
- 77.- Moller B.R., E.A. Freundt et. al.  
Experimental infection of the genital tract of female gri-  
vet monkeys by Mycoplasma hominis.  
Infection and immunity Apr. 1978, p. 248-257. vol. 20 No. 1
- 78.- Hutson, M.A., W.M. Ludwig, R.H. Purcell, R. Cate, D. Taylor,  
Robinson and R.M. Chanock. 1965.  
Exudative pharyngitis following experimental Mycoplasma ho-  
minis type 1.  
J. Am. Med. Assoc. 192: 1146-1150
- 79.- Peterson; L. Oster, T.H. Ham, y M. Finland..  
Cold agglutinines (autohemagglutinins) in primary atypical -  
pneumonias. Science, 97, 167, 1943.
- 80.- Purcell, R.H. R.M. Chanock.  
Role of mycoplasma in human respiratory disease.  
Med. Clin. N. Amer., 52, 791, 1962.
- 81.- Razin, S., and J. G. Tully. 1970  
Cholesterol requirement of Mycoplasmas.  
J. Bacteriol 102: 306-310;
- 82.- Rodwell, A.W.  
The stability of Mycoplasma mycoides.  
J. Microbiol 40: 227, 1965.
- 83.- Rytel y W. Michael  
Primary atypical pneumonias: current concepts.  
Amer. J. Med. Sci., 247, 84, 1964.

- 84.- Shepard C. M. and D. Lunceford  
 Diferential agar medium (A<sub>7</sub>) for identification of Ureaplasma urealyticum (Human T-Mycoplasmas) in primary cultures - of clinical material.  
 J.C.M. june 1976.  
 p. 613-625, vol. 3 No. 6.
- 85.- Shepard M.C. 1967  
 Cultivation and properties of T strains of Mycoplasma asso- ciated with non gonococcal urethritis.  
 Ann. N.Y. Acad. Sci. 143: 505-514.
- 86.- Shepard, M.C. 1966.  
 Human Mycoplasma infection.  
 Health lab. Sci. 3: 163-169.
- 87.- Shepard, M.C. 1956  
 T-form colonies of pleuropneumonia like organisms.  
 J. Bacteriol. 71: 362-369.
- 88.- Smith, P.F.  
 Comparative physiology of pleuropneumonia like an L type - organisms.  
 Bact. Rev. 28:97 (1964).
- 89.- Smith, P.F., J.G. Lecce, and R.J. Lym. 1954 lipoproteins - as a growth factor for certain pleuropneumonia like orga- nisms.  
 J. Bacteriol. 68: 627-633.
- 90.- Stanbridge, E.J. 1971.  
 Mycoplasmas and cell cultures.  
 Bacteriol. Rev. 35: 206-227.
- 91.- Steinberg, F., R.J. Whith, S.L. Fuld, R.R. Gutekunst, R.M. Chanock, L.B. Senterfit.  
 Ecology of Mycoplasma pneumoniae infections in marine re- cruits at Parris Island, South Carolina.  
 Am. J. Epidemiol. 89: 62-73, 1969.

- 92.- Sterner, G.S.A.; G. Turnevall, y S. Woluntis.  
Infections with Eaton agentin pneumonia.  
Acta Med. Scand., 178, 751, 1965.
- 93.- Tood-Sanford  
Diagnóstico clínico por el laboratorio.  
Quinta edición Ed. SALVAT S.A.  
p-. 1022-1028.
- 94.- Washburn, L.R., J.H. Hoghes, and N.L. Somerson. 1978  
Mycoplasma growth factors in bovine serum fraction.  
J. Bacteriol. 135:818-827.
- 95.- Watson G. L. Scott  
The treatment of Mycoplasma pneumoniae infections.  
J. Med. 22 (5): 361-5 Dec. 1977.
- 96.- Weibull, C., and Gylleng, H.  
Metabolic properties of some L forms derived from derived  
from Gram positive and Gram negative bacteria.  
J. Bact., 89: 1443, 1965.
- 97.- Withe R. Bristol.  
Mycoplasma pneumoniae in adults.  
Med. J. 92 (341-342): 9-11, 1977.
- 98.- Williams P.P., and J.E. Gallagher  
Cytopathogenicity of Mycoplasma hyopneumoniae in porcine -  
tracheal ring and lung explant organ cultures alone and in  
combination with monolayer cultures of fetal lung fibro-  
blasts.  
Infection and Immunity.  
may 1978 p. 495-502. vol. 20 No. 2
- 99.- Windsor, G.D., D.G. Edward, and J.A. Trigwell. 1975  
A solid medium for culture and identification of human T.-  
Mycoplasmas.  
J. Med. microbiol. 8: 183-187.

- 100.- Yehudith Naot and Shoshana Merchana.  
Inhibition of Mycoplasma Induced lymphocyte activation by-  
sodium aurothiomalate.  
Infection and Immunity, july 1978.  
p. 340-341 vol. 21 No. 1.