

Esferoplastos, protoplastos y formas L bacterianas: Su posible papel en el proceso infeccioso

J. M. Porres*

I. Introducción

En los últimos años hemos sido testigos del creciente número de publicaciones referentes al hallazgo en material clínico de ciertos microorganismos con propiedades que han revolucionado el enfoque del diagnóstico en algunas enfermedades infecciosas, así como su tratamiento. A su vez estos microorganismos, dada su sencillez, están siendo cada vez más utilizados como modelos bioquímicos para el estudio de procesos metabólicos.

II. Historia

Fue Pfeiffer, en 1894, el primero en observar, en sus estudios sobre *Vibrio cholerae* lo que actualmente conocemos como formas L. Hoffstadt y Youmans describieron en 1932 las colonias G. En 1935 Klieneberger-Nobel llevó a cabo el primer estudio a fondo de las formas L del *Streptobacillus moniliformis* (L hace referencia al Instituto Lister, de Londres).

Otro pionero en la investigación de las formas L es Dienes², quien en 1941 aisló por primera vez una forma L (Bacteroides) de material clínico. En 1948, Eagle publicó unos trabajos sobre la penicilina, describiendo el "fenómeno paradójico de zona". El término protoplasto fue introducido en la literatura por Weibell en 1953, quien tomándolo prestado de botánica, lo aplicó a unos microorganismos obtenidos en el laboratorio. En 1956, Lederberg enriqueció nuestro vocabulario con el término esferoplasto. Finalmente, ha sido MacDermott quien insistentemente ha sugerido en los últimos años el posible papel patógeno de las formas L.

III. Terminología

Los términos que han ido apareciendo en la literatura han sido utilizados por muchos investigadores indiscriminadamente, creando cierta confusión sobre el significado que encierran. En 1966, cierto número de investigadores se reunieron en los Estados Unidos con el objeto de recopilar los conocimientos adquiridos en

* Brown University. School of Medicine. The Mirian Hospital. Providence. U.S.A.

la materia, pero no consiguieron adoptar una nomenclatura que fuese universalmente aceptada. Desde entonces, la mayoría de los trabajos que aparecen van acompañados de una breve descripción de lo que el autor entiende por los términos por él utilizados.

A continuación referiremos algunos de estos términos dando una descripción de los mismos que concuerde con el contenido de este artículo, para claridad del lector. Estas definiciones no son aceptadas universalmente, pero son aceptadas por un gran número de investigadores con fines prácticos.

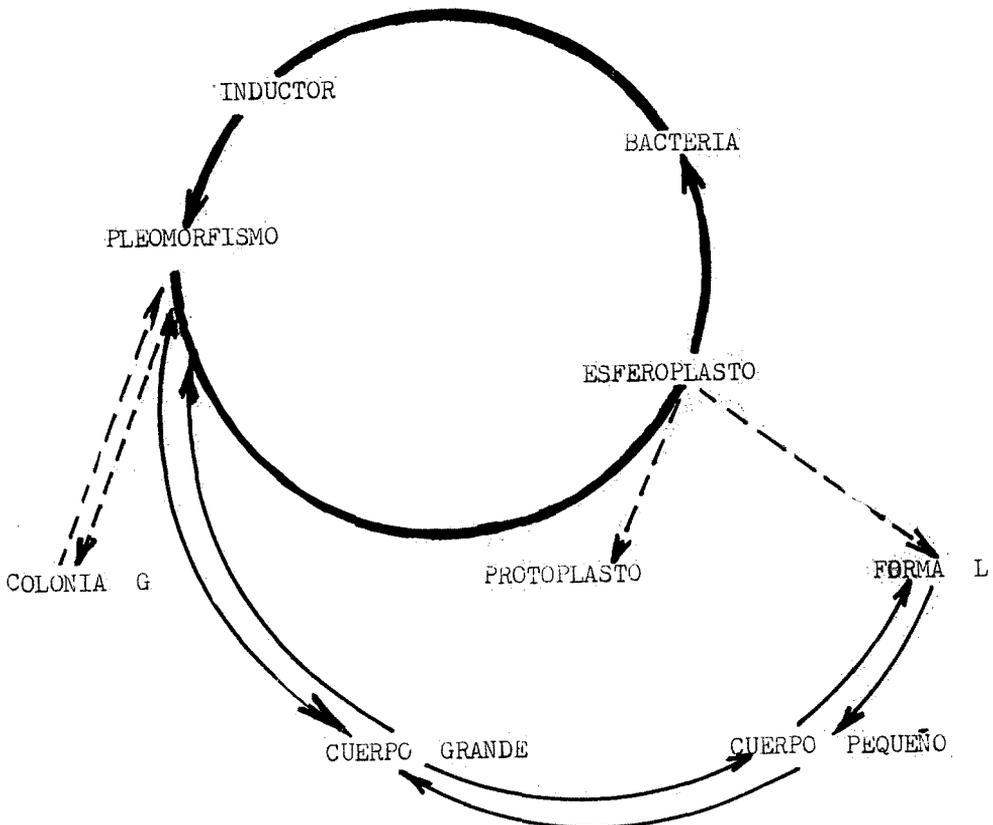
Los diversos tipos de células, descritos a continuación, tienen como común denominador el poseer una pared celular con algún grado de alteración, siendo el tipo de alteración lo que las diferencia:

Fase L: Es un término general, inespecífico, aplicable a todas ellas.

Forma L: Célula osmóticamente frágil sin pared celular y que puede multiplicarse indefinidamente sin revertir a la forma original.

Protoplasto: Célula osmóticamente frágil, sin pared celular. No puede multipli-

CICLO DE LA FASE L



carse pero puede aumentar de tamaño. No revierte.

Esferoplastos: Células cuya pared celular está parcialmente alterada y ha perdido total o parcialmente su rigidez. Puede multiplicarse y revertir. Puede ser osmóticamente frágil.

Fragilidad osmótica: Cualidad por la que ciertas células pierden su integridad si el medio en que están en suspensión es de baja presión osmótica.

Colonia L: Es una colonia en forma de "huevo frito" cuyo centro crece hacia el espesor del agar. Su periferia permanece en la superficie y es delgada y vacuolada. Su tamaño oscila entre 0'5-1 mm \varnothing . Están compuestas de cuerpos grandes, cuerpos pequeños y formas L. A veces presentan formaciones filamentosas.

Cuerpos grandes: Constituyen un estado de transición en la fase L. Suelen contener un cierto número de elementos granulares. El medio ambiente condiciona su forma y tamaño, el cual puede alcanzar las 50 micras. Puede multiplicarse por gemación, división o fragmentación en cuerpos pequeños.

Cuerpos pequeños: Pueden verse contenidos en un cuerpo grande o creciendo de su periferia, penetrando en el espesor del agar. Constituyen la unidad mínima reproductora y su tamaño oscila alrededor de las 0'1 micras.

Colonia G: Compuesta de elementos granulares (de donde deriva su nombre). Difiere de las colonias L por no presentar el aspecto de "huevo frito". Muy pequeñas, a veces microscópicas.

Fenómeno paradójico de zona: Eagle³ observó, al estudiar la acción de la penicilina, que a ciertas concentraciones se obtiene inhibición del crecimiento bacteriano pero que concentraciones por encima o por debajo de ellos no producen ese efecto. Este fenómeno, del que toda-

vía carecemos de una explicación aceptable, ha sido descrito con otros antibióticos y parece ocurrir "in vivo" igualmente.

De acuerdo con esta nomenclatura, la mayoría de los trabajos publicados tratan en realidad de esferoplastos, ya que casi todos ellos hacen referencia a la reversión de los microorganismos con los que operan.

IV. Producción

Desde los primeros trabajos llevados a cabo con bacterias, se sabe que algunos cultivos presentan un cierto pleomorfismo, desarrollando en ocasiones formas gigantes consideradas como formas de involución, incapaces de multiplicarse. Estas "formas bacterianas" han sido observadas en cultivos de distintas especies bacterianas y también se ha visto que son capaces de reproducirse.

El cultivo pleomórfico, tan fácil de obtener "in vitro", constituiría un estadio intermedio (inestable) entre las bacterias y sus fases L. Las formas L serían bacterias con una morfología alterada pero estable, que han adoptado un modo de reproducción diferente.

Todos los agentes capaces de inducir crecimiento en fase L pueden producir cultivos pleomórficos si se emplean a baja concentración. Este pleomorfismo puede ocurrir, además, en cultivos envejecidos, previamente a su lisis, o expuestos al frío, o a ciertas sales metálicas, y tienen lugar tanto en medio sólido como en medio líquido.

Las sustancias con capacidad de inducir crecimiento en fase L son muy diversas, y entre ellas se encuentran:

Prácticamente todos los antibióticos conocidos y especialmente la presencia de suero.

Enzimas: tales como lisozima, leucosima C y lisostafina.

Aminoácidos tales como glicina, metionina y fenilalanina.

Ciertos componentes del suero, tales como anticuerpos, complemento y otros componentes aún no identificados.

Cuando se emplean antibióticos como agentes inductores se producen esferoplastos con mayor facilidad. Las formas L aparecen únicamente si el medio de cultivo es un medio sólido, mientras que en medio líquido los protoplastos son más fáciles de obtener. Parece ser que en medio líquido, únicamente las células adheridas a una superficie (como la del recipiente) encontrarían el soporte adecuado para su multiplicación. Algunos investigadores, como Lederberg¹⁰, opinan que la separación entre protoplastos y formas L es artificial y llamarían protoplasto a aquellas células que aumentan de tamaño en un medio líquido, y formas L a las que producen una colonia en "huevo frito" en un medio sólido.

Una vez obtenidas las colonias L en un medio sólido, la ulterior multiplicación de las mismas en medio líquido puede conseguirse únicamente inoculando el caldo con un bloque de agar que contenga varias colonias.

En la producción de cultivos en fase L, además del inductor se requiere la presencia de un estabilizador osmótico con el objeto de impedir la lisis osmótica de los organismos producidos. Son muchas las sustancias empleadas a tal fin, tales como cloruro sódico, cloruro de cesio, tartrato potásico, polietilenglicol, cloruro amónico, cloruro cálcico, sacarosa y otras muchas. En ocasiones, utilizando un control con estabilizador osmótico pero sin inductor, se ha visto que tiene lugar cierta formación espontánea en fase L, lo que sugiere se trata de un

fenómeno en algún modo relacionado con el ciclo natural de las bacterias, relativamente fácil de producir y que la presencia de un estabilizador osmótico es más importante que el tipo particular de sustancia utilizada. No obstante, algunas especies de microorganismos producen crecimiento en fase L en un determinado medio con mayor facilidad que otras.

La elevada osmolaridad permitiría el aumento de tamaño de la célula. Si la pared celular está alterada, la capacidad de crecimiento subsiste pero la de división dependerá del medio ambiente. Así, la formación de cuerpos grandes y pequeños únicamente tiene lugar si existe una protección más sólida, como cuando se utilizan agar o membranas de filtro como soporte para el cultivo.

Se pensó que el suero, humano o de caballo, fresco o inactivado, era imprescindible para su producción, pero varios autores han comunicado recientemente haber tenido éxito en sus cultivos sin su utilización. Varios investigadores han obtenido lo que ellos llaman forma R mediante la utilización de un sistema con anticuerpos y complemento. Las formas R serían bacterias cuya morfología no ha sufrido ninguna aparente modificación pero que han perdido la capacidad de multiplicarse. Si estas formas R son sometidas a la acción de la lisozima, se convierten en formas L —de nuevo capaces de multiplicarse en un medio sólido— o en esferoplastos, capaces de multiplicarse y revertir.

Poetschke ha producido fase L de *Corynebacterium* (difteroides) simplemente exponiéndolas al suero humano normal, lo que en cierto modo puede explicar la creciente frecuencia con que vemos en clínica casos de endocarditis bacteriana subaguda producida por difteroides, de curso persistente y resistente a la penicilina.

En cuanto a la cantidad de antibiótico, por ejemplo penicilina, necesaria para producir crecimiento en fase L, la producción es máxima para una cierta concentración, siendo cualquier cantidad por encima o por debajo de ésta, menos eficaz. Esto es particularmente cierto para aquellos microbios sensibles a la penicilina, ya que para los resistentes, cuanto mayor sea la concentración del antibiótico tanto mayor será la producción. La concentración óptima de antibiótico es, además, independiente para cada cepa microbiana.

En muchos casos se ha podido ver la formación espontánea de esferoplastos. Tras 100-120 horas de cultivo, el recuento de esferoplastos comienza a aumentar y lo hace al mismo ritmo que el recuento del cultivo original disminuye. Estos esferoplastos son osmóticamente resistentes. Los enzimas autolíticos juegan con toda probabilidad un papel importante al actuar sobre los enlaces de polimerización de la pared celular, como sugieren los trabajos de Shockman^{12, 13, 14}, en los que se ve que las autolisinas del *S. faecalis* potencian la acción de la lisozima en la formación de esferoplastos.

Se ha comprobado que las lisinas de ciertos fagos pueden producir crecimiento en fase L "in vitro" y que algunos cultivos infectados con fagos dieron lugar a la formación de crecimiento en fase L. Es posible que este mecanismo ocurra también "in vivo", lo que podría explicar la marcha de ciertas infecciones crónicas, pero hasta el momento actual, carecemos de evidencia de que tal sea el caso.

La acción de la lisozima en la inducción de la fase L se basa en la degradación de la pared celular por la enzima, a menudo seguida de la extrusión de los mesosomas. Lo sorprendente es que los organismos en fase L sin mesosomas conserven su capacidad de reversión y de multiplicación.

Se ha visto que en muchos casos, si no en todos, el protoplasto emerge a nivel del septo de división. La explicación de este fenómeno parece ser que es precisamente a nivel del septo donde la síntesis de la pared celular es más activa, y por lo tanto más susceptible a la penicilina. Este septo, ahora poco polimerizado por la acción de la penicilina, queda a la merced de los enzimas autolíticos que, como se ha demostrado al menos para el *S. faecalis* en nuestro laboratorio, están concentrados en forma activa a nivel del septo. Las autolisinas encuentran pues una pared poco polimerizada a ese nivel y por lo tanto más fácil de romper.

Gooder señala en sus trabajos que los organismos en fase L podrían ser variantes producidas espontáneamente y que normalmente sufrirían lisis. Su hallazgo en tejidos y otros materiales clínicos podría explicarse por la presencia en ellos de poliaminas, calcio, magnesio y otras sustancias que ejerzan un papel osmoprotector. En este caso, deberíamos hablar de supervivencia de la fase L "in vivo" más que de la producción de fase L "in vivo". En este sentido apuntan igualmente los trabajos de Godzeski⁴, quien sostiene que la capacidad de los microorganismos de perder al menos parte de su envoltura rígida y existir en fase L, es una propiedad inherente de todos los microorganismos y cuya manifestación depende probablemente del medio ambiente. No obstante, se ha podido aislar de varios tejidos una sustancia, aún no identificada, que incorporada a los medios de cultivo induce crecimiento en fase L.

Poco se ha investigado sobre el fenómeno paradójico de zona descrito por Eagle. Lederberg¹⁰ opina que los microorganismos que sobreviven en presencia de una concentración de antibiótico superior a la mínima inhibitoria, como la que aparece alrededor de un disco de antibiótico de un antibiograma, por dentro de la

zona de inhibición (donde la concentración del antibiótico es mayor que en la periferia de la zona de inhibición) pertenece a la fase L. Tipper y Strominger¹⁵ sugieren como explicación de este fenómeno el que la penicilina a baja concentración no inactivaría totalmente la transpeptidasa responsable de la síntesis de la pared celular y el resultado sería una pared celular débil, y por lo tanto muy sensible a enzimas autolíticas y a diversos agentes externos. Si la concentración de penicilina es elevada, la inhibición de la síntesis de la pared celular sería más completa y como resultado de la misma el microorganismo no adquiriría pared nueva alguna, pero la pared que poseía previamente presentará todavía una rigidez normal, eficaz para proteger al protoplasto contenido en su interior.

Las colonias G (granulares) han sido observadas accidentalmente en ciertos estudios llevados a cabo con antibióticos, y su aparición resulta difícil de predecir con nuestros conocimientos actuales ya que sólo aparecen dentro de una limitada gama de concentraciones del antibiótico, justo por encima de la concentración mínima inhibidora. Los elementos que las componen muestran un metabolismo y ritmo de multiplicación enlentecidos, aunque conservando la mayoría de las características del cultivo original. Una propiedad general de estas células es su gran resistencia a los antibióticos (2-10 veces más resistentes que el cultivo original), probablemente por su metabolismo enlentecido. Las colonias G son muy difíciles de mantener y generalmente re-verten al transferirlas a un medio sin antibiótico.

Las colonias G han sido descritas independientemente de la fase L pero es más que probable que ambos procesos estén relacionados ya que los dos son inducidos por los mismos agentes y en condiciones similares, presentando muchas características en común. Así, por ejemplo, es muy probable que las colonias G

aisladas de material clínico representen formas iniciales en el proceso de reversión de organismos en fase L producidos "in vivo".

En nuestra experiencia, las células componentes de las colonias G mostraron un gran pleomorfismo y en general su tamaño era mayor que el de las células del cultivo original. Hemos podido observar su aparición en cultivos procedentes de material clínico y alrededor de los discos en los antibiogramas de rutina. Generalmente desaparecen tras uno o dos subcultivos y ésta es probablemente la razón por la que son pocos los autores que se han detenido a pensar sobre el papel que puedan jugar en la etiología o persistencia del proceso infeccioso. En la literatura se encuentran referencias a aislamiento en material clínico de colonias G de estafilococo, estreptococo, shigela, salmonela, gonococo, brucela, pseudomonas, E.coli y otras especies.

V. Propiedades generales de los organismos en fase L.

La virulencia, resistencia al suero, facilidad de conversión a la fase L, así como los efectos sufridos por la fagocitosis y por el sistema anticuerpo-complemento, son propiedades que parecen estar de algún modo relacionadas.

Los organismos en fase L de distintas especies varían en su resistencia al medio ambiente. Su estabilidad es susceptible de inducción y una vez obtenido su crecimiento en medio sólido, es posible adaptarlas primero a crecer en un medio líquido hiperosmótico, y gradualmente reducir la concentración de suero o sales hasta alcanzar las propias de los medios de cultivo ordinarios. Es posible que la multiplicación de las formas L no sea una división activa sino un simple fenómeno físico, producto del continuo crecimiento del citoplasma, sin alteración aparente, que avanza en el medio

ambiente rodeándose de una membrana celular de gran plasticidad.

Susceptibilidad a los antibióticos: No existe acuerdo sobre la susceptibilidad de los organismos en fase L a los antibióticos. Unos investigadores creen que en general son altamente resistentes a los antibióticos, a excepción de la anfotericina B, nystatina y algunas sulfamidas. Sin embargo, la opinión más extendida es la de aquellos que consideran a los organismos en fase L más resistentes que el cultivo original a la penicilina, cicloserina y otros antibióticos que actúan a nivel de la pared celular, pero más sensibles a otros antibióticos como eritromicina, tetraciclina y oleandomicina. La razón de este desacuerdo es probablemente la heterogeneidad del material con que cada investigador trabaja. Por ejemplo, parece demostrado que aquellos organismos en fase L que presentan mayor estabilidad (menor tendencia a revertir) son más resistentes. De todos modos, estos estudios sobre susceptibilidad a los antibióticos no parecen tener una gran significación porque únicamente estudian la concentración mínima inhibidora (bacteriostática) y resulta muy difícil de evaluar la sensibilidad de organismos que de por sí son muy difíciles de cultivar.

VI. Reversión al cultivo original

Este aspecto ha sido ampliamente estudiado por la importancia que presenta para el laboratorio clínico, donde es muy difícil llegar a un diagnóstico de especie sin haber obtenido previamente su reversión.

Parece haber acuerdo en que la facilidad con que un organismo en fase L revierte es inversamente proporcional al tiempo en que ha estado en presencia del agente inductor.

En resumen, nuestros conocimientos se limitan a diversos trucos que, en ocasio-

nes, han sido útiles para lograr la reversión:

1. Uso de medios de cultivo conteniendo un 25 % de gelatina.
2. Aumento de la concentración de agar en el medio hasta 2'5 %.
3. Pase a un medio sin suero de un microorganismo en fase L que previamente había sido cultivado en un medio con suero.
4. Uso de medios a los que se ha añadido extractos de levaduras y precursores de la pared celular.
5. Inoculación in vivo en algunos tejidos de animales de experimentación.

Una publicación de Landman⁹ aparecida recientemente proyecta nueva luz sobre el problema de la reversión. Como la mayoría de los organismos que revierten carecen de mesosoma, él llega a la conclusión de que esta estructura no es importante para la reversión. En el caso de la reversión en gelatina, el material nucleoide parece condensarse al mismo tiempo que el organismo adopta un claro pleomorfismo. Más adelante, la envoltura celular se hace patente, seguida por la aparición del mesosoma. El proceso de la reversión tiene lugar de forma sincrónica y previamente a la multiplicación. Landmann consiguió un 100 % de reversión sin aumento en el recuento total de organismos. Las mejores condiciones para la reversión son un medio con gelatina de consistencia firme, lo que hace pensar en un mecanismo puramente físico.

El uso de gelatina también ha dado buenos resultados en nuestras manos al tratar de recuperar microorganismos de tejidos de ratón sano. Las placas de gelatina dieron invariablemente un recuento mucho más alto que utilizando el mismo medio sin gelatina. La diferencia en número fue atribuida a microorganismos revertidos.

VII. Patogenicidad de los microorganismos en fase L

Una vez vista la facilidad de conversión a la fase L, la frecuencia con que el proceso ocurre espontáneamente, la multiplicidad de agentes capaces de inducir esta conversión y los primeros aislamientos "in vivo", el problema de la posible patogenicidad de estas formas bacterianas atípicas adquirió gran importancia.

En teoría, y para el fin que nos proponemos aquí, tras la inoculación "in vivo" de un microbio en fase L, pueden presentarse tres eventualidades:

1. Que no reviertan ni produzcan toxinas.
2. Que no reviertan, pero que produzcan toxinas.
3. Que reviertan a la forma general.

Los experimentos diseñados para estudiar estas posibilidades, utilizando diversos animales y esquemas de inoculación, así como huevos embrionados y tejidos de cultivo, han proyectado cierta luz, aunque en ocasiones los resultados parecen equívocos, probablemente por las diferencias en el material inoculado, vía y dosis de inoculación, edad y sexo de los animales.

Resumiendo, se ha podido ver que:

1. Microbios en fase L que no revierten tras su inoculación parecen carecer de poder invasivo.
2. Algunos microorganismos en fase L son capaces de producir toxinas tras su inoculación, produciendo los consiguientes síntomas en el animal inoculado. Scheibel demostró que la fase L del *Cl. tetani* produce tanta toxina como el cultivo original, y a veces más.
3. Algunas vacunas preparadas con organismos en fase L proporcionan protección contra infecciones producidas con la forma original.
4. Cultivos en fase L inoculados en saco alantoideo provocaron la infección y muerte del embrión, con y sin reversión de la fase L.
5. Guze⁵ inoculó enterococos en la médula renal de ratas vivas y administró penicilina. Los ratones desarrollaron pielonefritis y de los tejidos en autopsia, solamente se pudieron recuperar organismos en fase L.
6. Koptelova⁸ inoculó organismos en fase L de estafilococos y de estreptococos en conejos, pudiendo producir meningitis. Parece ser que las meningitis producidas por organismos en fase L son menos malignas que las producidas por sus formas originales.
7. Wittler^{16, 17} produjo, en ratones, infecciones de tipo benigno tras la inoculación de organismos en fase L que no revirtieron.
8. Monos inoculados con la fase L de estreptococos desarrollaron amigdalitis seguida de complicaciones cardíacas.
9. Freeman observó la muerte de células fagocitarias varias horas después de la ingestión de organismos en fase L.
10. La inoculación intracutánea de fase L de salmonela da lugar a la formación de abscesos asépticos.
11. En muchos casos, la inoculación de organismos en fase L va seguida de su permanencia en los tejidos sin producción de síntomas. En otros casos, desaparecen sin dejar rastro.
12. Freimer demostró antigenicidad cruzada entre antígenos localizados en la membrana celular de estreptococos y sarcolema de músculo cardíaco, estriado y liso, lo que sugiere que estos antígenos que normalmente permanecen inaccesibles para el huésped, se hacen aparentes cuando el microorganismo sufre la transformación a la fase L, siendo entonces posible el desarrollo de complicaciones inmunológicas. Algunas enfermedades generalmente consideradas de índole inmu-

nológica suelen precederse de una infección vanal o incluso de la simple colonización por cepas bacterianas saprofitas. Por ejemplo, en algunos procesos reumáticos —donde los cultivos son tradicionalmente negativos— un buen número de investigadores está aislando ahora fase L de estreptococo. No sería sorprendente que un proceso análogo fuese responsable de algunos “catarros de repetición”, donde la colonización de nariz y garganta por estreptococos, neisseria y otros componentes de la flora normal se seguiría de una reacción alérgica a antígenos de la membrana celular de estos

gérmenes. Es bien sabido que muchos de estos pacientes se benefician de vacunas confeccionadas con estos microbios.

En un paciente en tratamiento con antibióticos, pueden aparecer organismos en fase L. Estos organismos pueden revertir más tarde, una vez interrumpido el tratamiento, y dar lugar a una recidiva. En algunos casos, organismos en fase L han sido recuperados, incluso varios años después del tratamiento. También se ha visto que la fase L de *Brucella* tiene una supervivencia intracelular mucho más larga que la forma original.

TABLA I

ORGANISMOS EN FASE L AISLADOS EN PROCESOS INFECCIOSOS

Fibrosis pulmonar quística	S.aureus
Endocarditis bacteriana subaguda	Enterococo Candida tropicalis S.aureus Difteroides
Leucemia	S.aureus Difteroides
Fiebre tifoidea	Salmonela
Adenitis cervical	Pseudomonas
Reumatismo poliarticular agudo	Estreptococo
Escarlatina	Estreptococo
Artrosis	S.aureus
Panadizos	Estafilococo
Meningoencefalitis	Listeria monocitogenes Estafilococo Estreptococo Hemofilus influenza Pneumococo
Tuberculosis	Micobacteria
Nefritis	Proteus Enterococo Estafilococo Estreptococo Alkaligenes faecalis Difteroides Hemofilus Neisseria Escherichia Micobacteria
Proceso infeccioso	Fase L identificada

TABLA II

MATERIAL CLINICO DEL QUE SE HA AISLADO FASE L

Líquido cefalorraquídeo		Estafilococo Enterococo Hemofilus influenza Pneumococo
Sangre		Estreptococo Difteroides Candida tropicalis Estafilococo Salmonella Enterococo Micobacteria Pneumococo Brucela
Leucocitos		Escherichia Bacteroides (Fusiforme)
Orina		Neisseria Escherichia Alkaligenes faecalis Proteus Enterococo Difteroides Hemofilus
Pus		Estafilococo
Biopsia	Riñón	Estreptococo Enterococo Estafilococo
	Timo	Difteroides
	Médula ósea	Difteroides
	Corazón	Estafilococo Enterococo
	Vejiga	Proteus

Se ha estudiado intensamente la presencia de organismos en fase L, tanto en individuos sanos como enfermos. Las tablas I y II resumen estos hallazgos. En individuos sanos, sólo en algún caso aislado se ha podido demostrar su presencia. En enfermos, se aislaron organismos en fase L en un 30 % de los hemocultivos, mientras que las técnicas habituales sólo detectaron un 10 % de cultivos positivos. En pacientes tuberculosos (casos probados) son muchos más los esputos que son positivos para la fase L

que para la forma típica de micobacteria, tanto por inmunofluorescencia como por tinción con Zhiel-Nielsen. Esto podría explicar lo que en realidad ocurre con los pacientes tuberculosos: poco tiempo después de comenzar el tratamiento, el esputo deja de ser positivo para la forma bacteriana típica pero en muchos casos sigue siéndolo para la fase L.

La formación de fase L "in vivo" parece facilitarse por el tratamiento con antibió-

ticos, desarrollo de inmunidad, larga duración de la enfermedad y el tipo de localización de la infección. Así, se ha visto que la supervivencia de la fase L es mucho más prolongada en pulmón y riñón que en peritoneo. Muchas veces estos organismos resultan difíciles de recuperar a menos que primero se trituren los tejidos cuidadosamente. Sobre la persistencia en riñón, se piensa que varios factores pueden jugar algún papel: Los iones amonio excretados por el riñón inactivan el componente C⁴ del complemento, lo que puede ayudar a explicar la persistencia en médula renal. Además, la médula renal goza de cierta hiperosmolaridad, al menos mayor que en hígado o bazo.

Se solía pensar que la terapia antibiótica podía fracasar si el antibiótico no llegaba hasta el microbio, y que esto podía ocurrir de alguna de las siguientes maneras:

1. Por la presencia de barreras impenetrables, tales como las vegetaciones de fibrina o las paredes de un absceso.
2. Por residir los microbios intracelularmente.
3. Por cierta inhibición ejercida por el medio ambiente de una lesión inflamatoria, antagonizando al antibiótico.

No es este lugar adecuado para extenderse en estos detalles, pero baste el decir que se ha demostrado que los antibióticos penetran en las vegetaciones de fibrina, en las paredes de los abscesos y que así mismo alcanzan a los organismos residentes dentro de una célula. La reacción inflamatoria no interfiere directamente con los antibióticos en general sino para ciertos pares antibiótico-bacteria y sólo en ciertos tejidos, y que en otros casos puede incluso potenciar el efecto antimicrobiano o al menos incrementar la afluencia de antibiótico al aumentar la vascularización localmente.

Si estas razones aludidas no explican el fallo de los antibióticos, es lógico buscar

la explicación en el propio microbio. Mc Dermott¹¹, quien tanto esfuerzo ha puesto en el estudio de estos problemas, habla de un estado de "indiferencia antibiótica" que ocurriría "in vivo" y que, en esencia, consistiría en un estado en el que la bacteria ni es fundamentalmente inhibida por la droga ni tampoco capaz de multiplicarse libremente en su presencia, como sería el caso de los microbios genéticamente resistentes al antibiótico. McDermott asocia este estado de "indiferencia antibiótica" con un desvío hacia el ciclo L por parte de la bacteria.

Corrientemente, para distinguir entre salud e infección, ponemos nuestra atención en los cambios desarrollados en los mecanismos de defensa del huésped, considerando al parásito como algo pasivo y relativamente constante, tanto si está produciendo enfermedad como cuando está en forma saprofítica. Pero parece más que probable que el paso de una infección de la forma latente a la activa requiera cierta adaptación por parte del parásito más que un simple fallo de los mecanismos de defensa del huésped. Mc Dermott cita como ejemplo el que todavía no se haya podido aislar *Treponema pálido* en casos de tabes dorsal, a pesar de admitirse generalmente como su agente causal.

VIII. Identificación de los organismos en fase L

La mayoría de las técnicas habituales en el laboratorio de microbiología clínica presentan limitada utilidad en este caso. La situación ideal sería la de obtener la reversión de la fase L seguida de su identificación, pero en ocasiones es muy difícil o sólo se consigue tras prolongado tiempo (2-12 meses) de subcultivo, del que nunca se dispone en un laboratorio de diagnóstico.

El enfoque más reciente es el del estudio genético, investigando y comparando

la composición y secuencia de las bases nucleotídicas del ácido desoxirribonucleico del material cromosómico, ya que éste se supone idéntico en la fase L y en su forma bacteriana típica. Por consiguiente, el primer paso sería determinar la relación (G+C) del organismo en fase L en cuestión, seguida por la búsqueda en la literatura de aquel género microbiano que presente una composición más similar. Ulteriormente, algunas pruebas bioquímicas pueden ayudar a aproximar la especie a que pertenece.

Dado que muchas de las características bioquímicas del cultivo bacteriano se conservan en la fase L, pueden ser empleadas como técnica auxiliar en su identificación. Cohen, Wittler y Faber¹ han llevado a cabo un extenso estudio a fin de determinar qué pruebas bioquímicas pueden ser de mayor utilidad en este sentido. Ellos llegaron a la conclusión de que las pruebas de la fosfatasa, oxidasa, catalasa, glucosa (oxidación-fermentación), desaminación de la fenilalanina, reducción de los nitratos, telurito y sales de tetrazolio son las más convenientes por su reproducibilidad. La utilización de los carbohidratos, por ser más susceptible de cambios genéticos o fenotípicos, no es considerada tan práctica.

La mayoría de los organismos en fase L conservan la capacidad de producir las toxinas propias de su especie, las cuales pueden a veces detreminarse con facilidad mediante pruebas de rutina.

Aunque una identificación por medios serológicos sería muy interesante, hay que tener en cuenta que las reacciones inmunológicas dependientes de componentes de la pared celular pueden no tener lugar aquí, según el grado de carencia de pared celular que la fase L en estudio presente. Las pruebas de inmunodifusión, fijación del complemento e inmunofluorescencia figuran entre las más recomendadas, pero el hecho de tener que ensayar toda una batería de

inmunosueros las hace poco prácticas en este caso, salvo para confirmar un diagnóstico de sospecha.

Si todos los pasos previos muestran un buen acuerdo, como prueba final confirmatoria de gran especificidad se puede utilizar la hibridación de DNA-DNA.

IX. Terapia

Se ha sugerido una serie de sistemas para impedir la formación de fase L "in vivo" o para eliminarla una vez producida, pero estas sugerencias teóricas todavía carecen en general de la confirmación por la experimentación en animales y humanos. En este sentido, sería de interés que varios grupos de investigadores y clínicos abordaran el problema en distintos sentidos a fin de poder obtener la suficiente información sobre estos gérmenes atípicos que nos permita desarrollar una logística adecuada contra ellos. Han sido utilizadas con éxito vacunas autógenas en el tratamiento de endocarditis bacterianas subagudas por difteroides donde los antibióticos, a los que estas bacterias eran sensibles (penicilina), no habían logrado erradicar la infección y se aislaron repetidamente organismos en fase L que demostraron ser de esa misma especie bacteriana.

Algunos autores recomiendan una terapia antibiótica combinada o alternante, utilizando dos antibióticos de distinto mecanismo de acción. Generalmente se recomienda que uno de los antibióticos sea eritromicina, triacetiloleandomicina o tetraciclina, y el segundo antibiótico uno que sea activo frente a la forma bacteriana de que se trate.

La kanamicina, en asociación con penicilina o cefalotina, parece ser eficaz en prevenir la formación de fase L y es superior a la combinación penicilina-estreptomina, ya que muchos de los organismos que desarrollan resistencia a la es-

treptomycin, suelen ser sensibles a la kanamicina todavía, mientras que lo inverso no es cierto.

Una medida muy clásica y de base puramente empírica en sus orígenes, es la ingesta frecuente de amplias cantidades de líquido en caso de infección renal, que es una de las infecciones donde es más probable la formación de fase L. Al disminuir la osmolaridad en el riñón se puede reducir la cuantía de organismos en fase L, como Kalmanson y Guze⁶ han demostrado en animales de experimentación, y ello a pesar de que el poder antiséptico de la orina, función de su osmolaridad, pH y contenido en urea, disminuya temporalmente como consecuencia de la dilución de la orina.

X. Micoplasmas y fase L de las bacterias

Debida a ciertas semejanzas en su morfología, durante mucho tiempo se supuso que ambos tipos de organismos eran una misma cosa, creando cierta confusión. Esta semejanza es debida probablemente a que el micoplasma también carece de pared celular.

Hoy día, sin embargo, no cabe lugar a duda sobre la falta de identidad de estos microorganismos, ya que se ha podido demostrar que la relación (G+C) es mucho menor en el micoplasma que en la fase L o que en cualquier bacteria conocida. También, los micoplasmas contienen en su membrana ciertos colesteroles nunca hallados en la bacteria.

A pesar de que los micoplasmas son mucho más exigentes en cuanto a la composición del medio de cultivo se refiere, son mucho más fáciles de aislar y cultivar que la fase L, y se encuentran más profusamente en la naturaleza. Otra diferencia es que el tamaño de la menor fase L hasta ahora encontrada es todavía

casi el doble que el del micoplasma más grande.

Aquellos autores que en un principio creyeron haber conseguido la reversión de un micoplasma a una forma bacteriana, como es el caso de Klieneberger-Nobel, estaban trabajando en realidad con fase L, como se han podido dar cuenta ellos mismos más tarde⁷.

XI. Conclusiones

Parece más que probable que la fase L constituye un fenómeno mucho más corriente en la naturaleza de lo que inicialmente se pensó, que está muy relacionado con el fracaso aparente de muchos tratamientos con antibióticos, cronicidad y recidiva de procesos infecciosos.

Para aumentar la eficacia en el diagnóstico de laboratorio deberían utilizarse medios capaces de recuperar la fase L. Aunque es preciso investigar más para obtener un medio de cultivo ideal, la gran cantidad de muestras procedentes de enfermos claramente infecciosos donde las técnicas de rutina no consiguen poner de manifiesto agente patógeno alguno, requiere que tanto médicos como personal de laboratorio tengan presente la posibilidad de estar frente a un caso por fase L.

Nuestros conocimientos actuales hacen suponer que el uso de medios de cultivo con agarosa (el agar a veces inhibe el crecimiento de la fase L) y el uso de medios con un 25 % de gelatina, constituirían una gran ayuda en el estudio de las muestras procedentes de este tipo de pacientes. Estos medios de cultivo no sólo facilitarían la recuperación de la fase L sino que además acelerarían su reversión a la forma bacteriana, más fácil de identificar. Estos cultivos deberían mantenerse en estudio por lo menos una o dos semanas antes de descartarlos.

Los organismos en fase L suelen ser extremadamente frágiles y por ello es probable que en las extensiones aparezcan como material amorfo, consecuencia de su mal trato. El estudio de preparaciones en fresco, o con colorantes en solución hipertónica, puede poner de manifiesto organismos que de otro modo se perderían. A tal efecto se ha propuesto el uso de naranja de acridina que, por su especificidad por los ácidos nucleicos, puede diferenciar los organismos en fase L de otros materiales presentes en la prepara-

ción. Con la tinción de Gram, suelen aparecer rosa, aunque nosotros hemos obtenido repetidamente, de material humano, formas teñidas en azul. Se ha recomendado filtrar las muestras a estudiar previamente a su cultivo, con el objeto de separar las formas bacterianas que, de estar presentes en el cultivo, podrían eclipsar el crecimiento de la fase L.

En los medios líquidos, deberían añadirse sustancias que aumenten la presión osmótica, tales como sacarosa o sales —particularmente magnesio.

BIBLIOGRAFÍA

1. COHEN, R. L. y col. *App. Microbiol.*, 26: 1.655, 1968.
2. DIENES, L. *J. Bact.*, 44: 37, 1941.
3. EAGLE, H. *Science*, 107: 44, 1948.
4. GODZESKI, C. W. y col. *Antimicrob. Agents Chem.*, 1.962: 843, 1962.
5. GUZE, L. B. *Microbial Protoplasts, Spheroplasts and L-forms*. William & Wilkins. Baltimore (U.S.A.), 1968.
6. KALMANSON, G. M. y L. B. GUZE. *J. A. M. A.*, 190: 1.107, 1964.
7. KLIENEBERGER-NOBEL, E. *The Bacteria*. Vol. I, pág. 361, Academic Press. New York, 1960.
8. KOPTILOVA, E. J. y V. J. POKROVSKY. *Zh. Mikrobiol.*, 41: 90, 1964.
9. LANDMAN, O. I. y col. *J. Bact.*, 74: 567, 1958.
10. LEDERBERG, J. y J. ST. CLAIR. *J. Bact.*, 74: 443, 1958.
11. McDERMOTT, W. *Pub. Health Rep.*, 74: 485, 1959.
12. SHOCKMAN, G. D. *Bact. Rev.*, 29: 345, 1965.
13. SHOCKMAN, G. D. y J. O. LAMPEN. *J. Bact.*, 84: 508, 1962.
14. SHOCKMAN, G. D. y col. *J. Biol. Chem.*, 230: 961, 1958.
15. TIPPER, D. J. y J. L. STROMINGER. *J. Biol. Chem.*, 243: 3.169, 1968.
16. WITLER, R. G. y col. *J. Gen. Microb.*, 14: 763, 1956.
17. WITLER, R. G. y col. *J. Gen. Microb.*, 23: 315, 1960.