

FORMAS DE RESISTENCIA (FORMAS L) DE ESCHERICHIA COLI (E.COLI): LA IMPORTANCIA DEL SEDIMENTO URINARIO

AUTORES

1. María Carmen Domínguez Grandal¹
2. Leticia Rodríguez Calviño^{1*}
3. Susana Romero Santos¹
4. Laura Rollán Manso¹

CORRESPONDIENTE AL AUTOR

1. María Carmen Domínguez Grandal¹
Maria.Carmen.Dominguez.Grandal@sergas.es
2. Leticia Rodríguez Calviño^{1*}
(ORCID
<https://orcid.org/0000-0002-1323-6755>)
leti.rodriguez36@gmail.com
3. Susana Romero Santos¹
(ORCID
<https://orcid.org/0000-0001-8666-4032>)
susana.romero.santos@sergas.es
4. Laura Rollán Manso¹
laurm@usal.es

¹Servicio de Análisis Clínicos, Complejo Hospitalario Universitario de Vigo (CHUVI), Vigo, Pontevedra, España.

*Autor para correspondencia

PALABRAS CLAVE

Keywords

Formas de resistencia *E. Coli*; Formas L; Infección de orina; Resistencia bacteriana. Resistance forms *E. Coli*; L forms; Urine infection; Bacterial resistance.

TÍTULO

Title

Formas de resistencia (formas L) de *escherichia coli* (*e.coli*): la importancia del sedimento urinario

Resistance forms (L forms) of *escherichia coli* (*e. coli*): the importance of a urinary sediment

RESUMEN

Summary

Introducción

La mayoría de las bacterias poseen una pared celular que las rodea, lo que les confiere forma y resistencia mecánica. En el año 1935, Emmy Klieneberger descubrió las formas L en el *Streptobacillus moniliformis*. Dichas formas L son variantes bacterianas que se originan de manera espontánea, con capacidad de reproducción, pero carentes de pared celular o bien defectuosa. Son formas difíciles de erradicar, puesto que suelen ser resistentes a los antibióticos que actúan sobre la pared celular, pudiendo permanecer latentes al ser fagocitadas sin ser destruidas. El principal objetivo es advertir sobre la importancia de formas de resistencia poco conocidas en la práctica clínica diaria.

Material y métodos

Estudio prospectivo realizado durante 6 años, de todas las formas L observadas en los sedimentos urinarios del área de orinas del laboratorio.

Resultados

Los casos detectados son mujeres, la mayoría mayores de 65 años, con un único germen identificado, *E. Coli* y que habían sido tratadas previamente con amoxicilina más ácido clavulánico o fosfomicina. Se informa al médico clínico de la presencia de estas formas, recomendándole suspender el tratamiento con antibióticos cuyo mecanismo de acción actúa sobre la pared bacteriana.

Conclusiones

Es importante la experiencia del observador para poder reconocerlas e identificarlas, puesto que son formas que pueden confundirse con levaduras. Debido al aumento a nivel mundial de las resistencias bacterianas, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en el año 2017 una lista de los patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos, encontrándose *E. Coli* en el grupo de prioridad crítica.

ABSTRACT

Introduction

Most bacteria have a cell wall that surrounds them, giving them shape and mechanical resistance. In 1935, Emmy Klieneberger discovered L forms in the *Streptobacillus moniliformis*. These L forms are bacterial variants that originate spontaneously, with reproductive capacity, but lacking or defective cell walls. They are difficult forms to eradicate, since they are usually resistant to antibiotics that act on the cell wall, being able to remain latent when phagocytosed without being destroyed. The main objective is to warn about the importance of these little-known forms of resistance in daily clinical practice.

Material and methods

Prospective study carried out over 6 years, of all the L forms observed in the urinary sediments of the urine area of the laboratory.

Results

The cases found are women, the majority over 65 years old, with a single identified germ, *E. Coli*

and who had previously been treated with amoxicillin more clavulanic acid or fosfomycin. We informed the clinical physician of the presence of these forms, recommending him to suspend the treatment with antibiotics whose mechanism of action acts on the bacterial wall.

Conclusions

The experience of the observer is important to be able to recognize and identify them, since they are forms that can be confused with yeasts. Due to the worldwide increase in bacterial resistance, the World Health Organization (WHO) published in 2017 a list of priority pathogens resistant to antibiotics, with *E. Coli* being in the critical priority group.

INTRODUCCIÓN

Prácticamente todas las bacterias poseen una pared celular formada por peptidoglicanos, siendo su presencia crucial para su integridad mecánica y determinar su forma (1).

Las formas L son variantes bacterianas con deficiencia en su pared celular por pérdida total o parcial de la misma (2,3), descubiertas

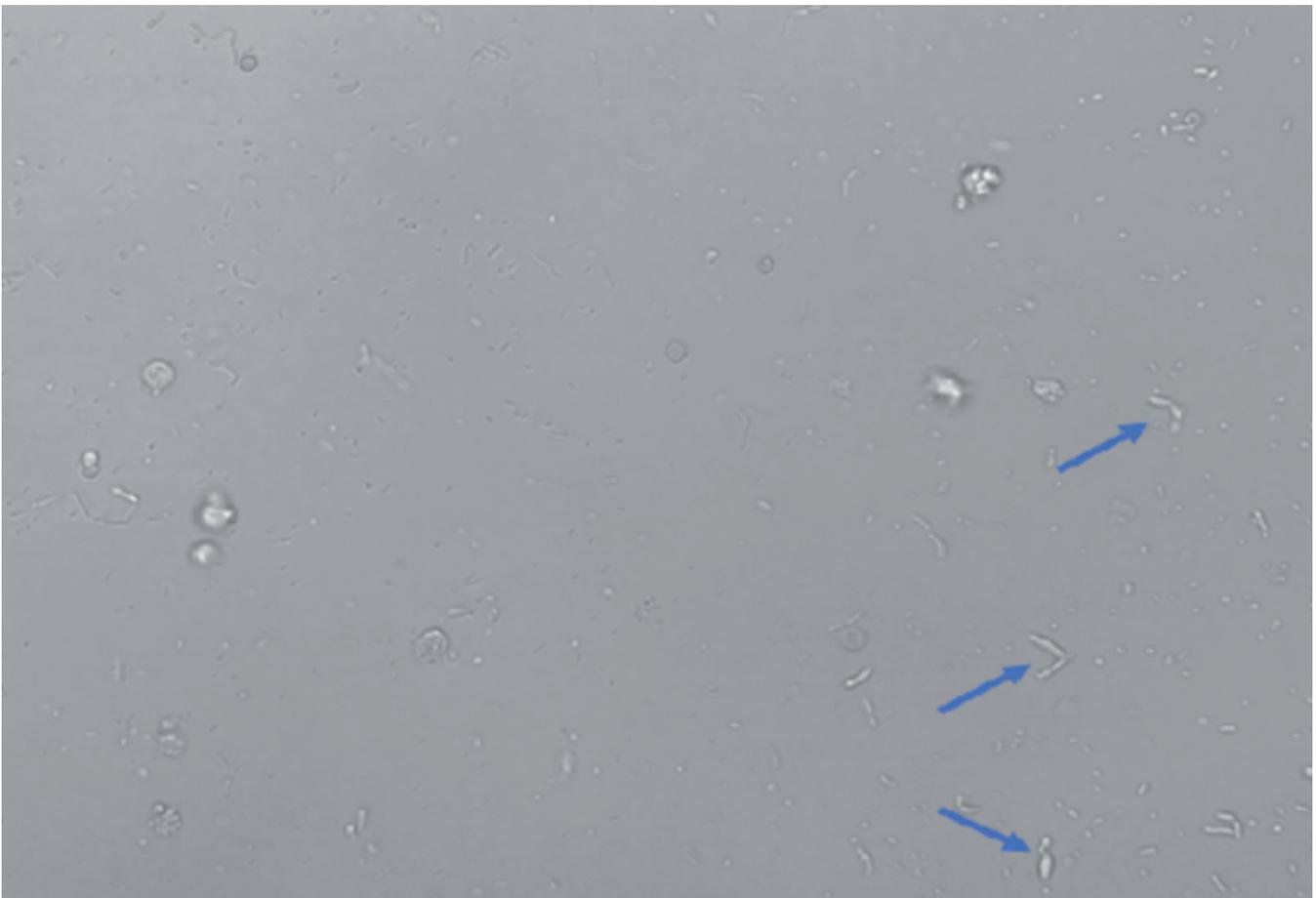


Figura 1.
Formas L vistas al microscópio óptico (señaladas con flechas azules).

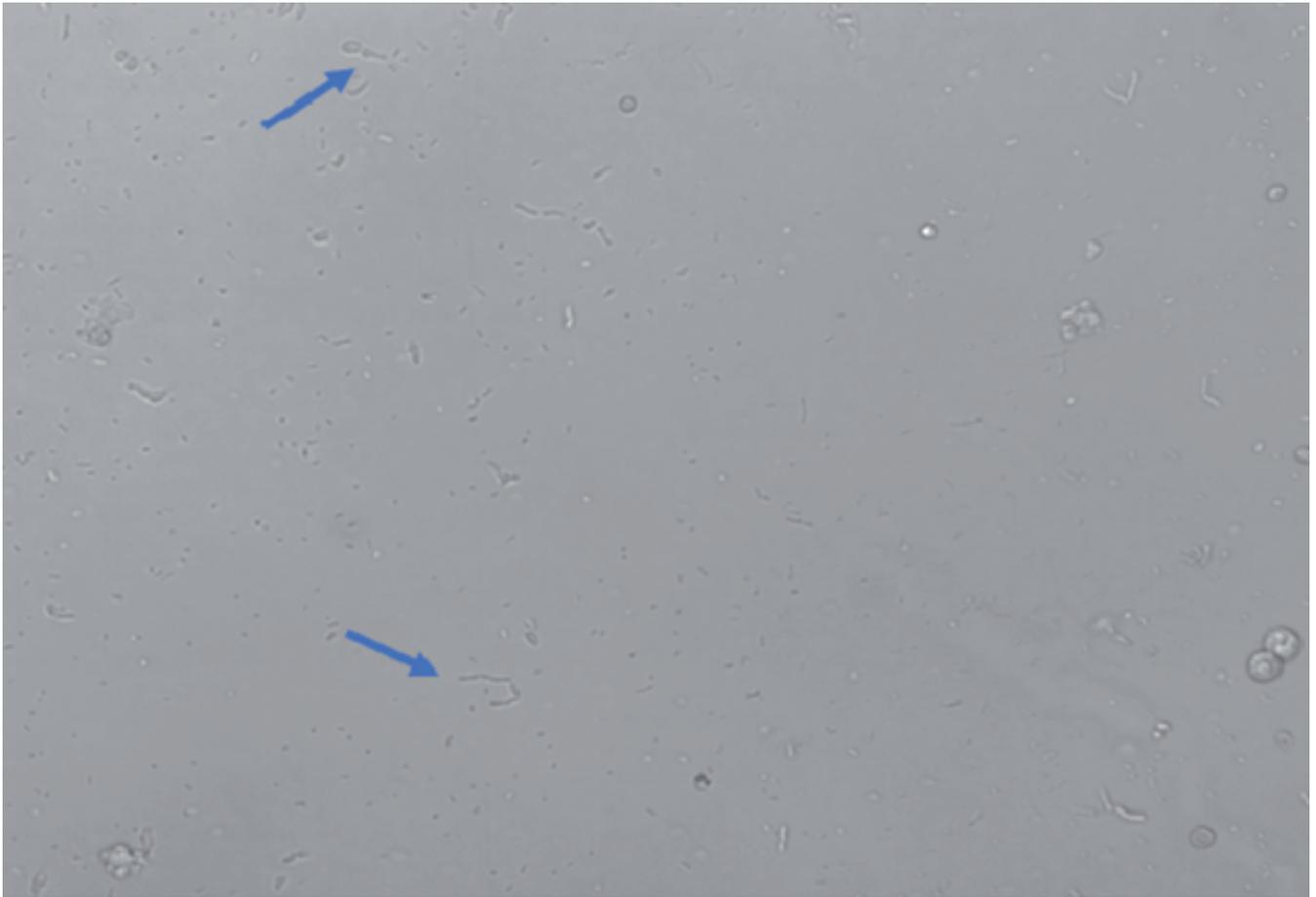


Figura 3.
Formas L vistas al microscópio óptico (señaladas con flechas azules).

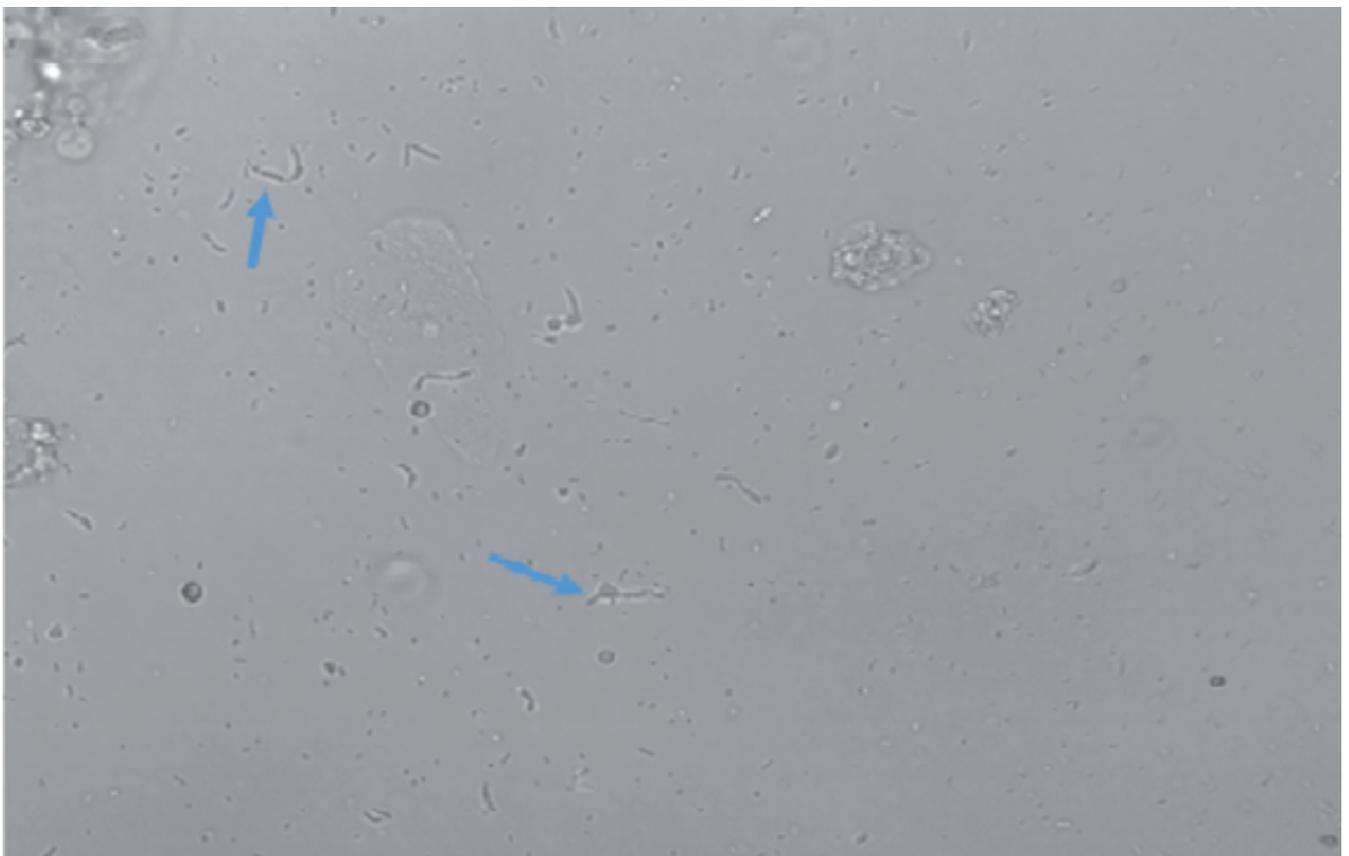


Figura 2.
Formas L vistas al microscópio óptico (señaladas con flechas azules).

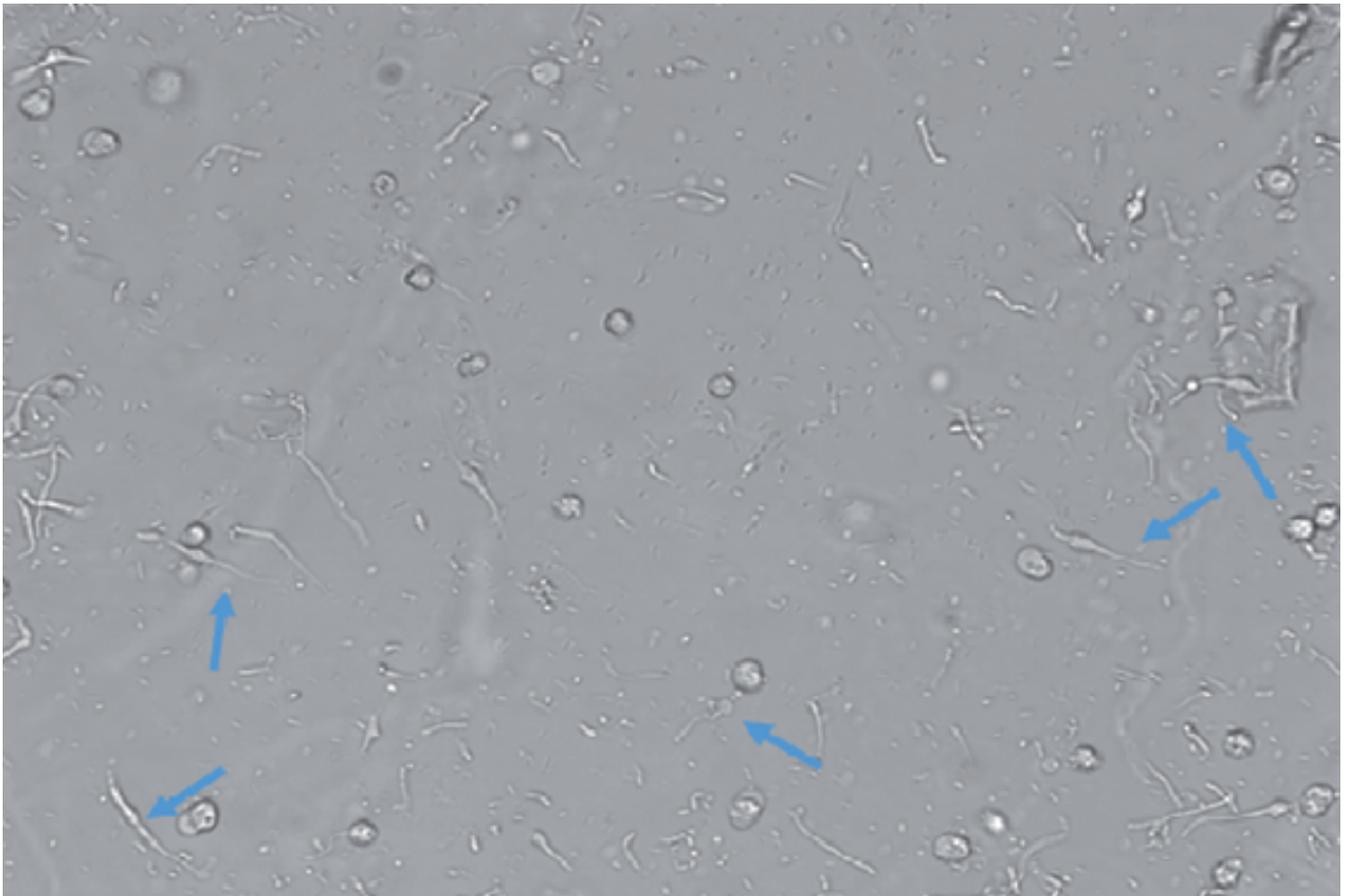


Figura 4.
Formas L vistas al microscopio óptico (señaladas con flechas azules).

por Emmy Klieneberger en el año 1935 (4). Estas formas de resistencia están favorecidas, entre otros factores, por los antibióticos que actúan sobre la pared celular, contribuyendo así a su supervivencia durante el tratamiento (5,6). Algunas formas L son transitorias, eliminándose cuando desaparece el agente inductor y revirtiéndose a la forma original; otras, sin embargo, son estables y persisten en el tiempo con el consiguiente reservorio de la forma patógena, pudiendo actuar en el momento favorable para las mismas (7,8).

La infección del tracto urinario (ITU) es actualmente un problema médico y económico muy importante, sobre todo en pacientes mayores y con comorbilidades asociadas (9,10). En muchos casos se producen recurrencias por la reinfección y/o persistencia de estas formas bacterianas, que pueden permanecer en estado de latencia, sobre todo al ser fagocitadas sin ser destruidas (11,12,13,14).

Debido al aumento a nivel mundial de las resistencias bacterianas y las consecuencias que este hecho supone, la OMS ha publicado en el año 2017 una lista de los patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana. En el grupo de

prioridad crítica aparecen las bacterias multirresistentes que son especialmente peligrosas, encontrándose en este grupo *E. Coli*, del grupo de las Enterobacterias (15).

Nuestro principal objetivo es advertir sobre la importancia de estas formas de resistencia, poco conocidas en la práctica clínica diaria.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el área de orinas del hospital, se formó en primer lugar a los Técnicos Superiores del Laboratorio Clínico y Biomédico (TSLCB), en el reconocimiento de las formas L visualizadas al microscopio óptico, ya que pueden confundirse con levaduras. Se ha llevado a cabo la búsqueda de formas L en el sedimento en un periodo de 6 años, registrándose las encontradas entre el año 2014 y el año 2019, ambos inclusive. Se han identificado un total de 5 pacientes con formas L en el sedimento de orina, que se distribuyen temporalmente de la siguiente manera: en el año 2015 no se aisló ninguna, dos en el año 2018 y en el resto de los años tres, una por cada año. Los cinco pacientes fueron mujeres con edades comprendidas entre

31 y 89 años, siendo dos menores de 40 años (31 y 35 respectivamente) y el resto mayores de 65 años (66, 75 y 89 respectivamente).

Cuando los TSLCB alertaban sobre la sospecha de formas L en un sedimento visualizado al microscopio óptico, siguiendo el protocolo de la sección, se sembraba la orina en una placa de siembra BD CHROMagar Orientation Medium (Beckton Dickinson), que es un medio cromogénico no selectivo para la identificación y diferenciación directa de patógenos del tracto urinario, constituido por una mezcla de cromógenos que liberan compuestos de colores diferentes al ser degradados por enzimas microbianas. Tras la siembra, las placas fueron guardadas en estufa a 37°C y observadas al día siguiente, identificándose el germen por el indicador de color, virando a rosa en todas ellas (típico de *E. Coli*). A partir de las colonias desarrolladas en las placas cromogénicas se realizó una tinción de Gram, observándose en todas ellas bacilos Gram negativos y encontrándose únicamente un solo tipo de bacteria. Con este diagnóstico presuntivo, se realizó el informe de laboratorio alertando a los clínicos de la presencia de formas L (figuras 1-4). Con posterioridad se ha confirmado el diagnóstico, realizándose urocultivo en el servicio de Microbiología, identificándose en todas ellas el patógeno *E. Coli*.

RESULTADOS

Las cinco pacientes encontradas en los 6 años estudiados fueron mujeres, siendo tres de ellas mayores de 65 años, y con un único germen identificado, *E. Coli*, perteneciente al grupo crítico (Enterobacterias) del listado de bacterias más resistentes publicado por la OMS. Estos datos coinciden con la evidencia de que las infecciones urinarias son más frecuentes en mujeres, pacientes de edad avanzada y mayoritariamente están producidas por *E. Coli* (16).

Todas estas pacientes habían sido tratadas previamente con amoxicilina más ácido clavulánico o fosfomicina, concretamente una de ellas con fosfomicina y el resto con amoxicilina más ácido clavulánico.

En todos los casos se ha informado al médico clínico de la presencia de estas bacterias, con la siguiente leyenda: "Se observan formas L. Por ser estas formas de resistencia bacterianas, se aconseja suspender el tratamiento antibiótico cuyo mecanismo de acción actúa sobre la pared bacteriana" explicándole también, vía telefónica, su significado.

DISCUSIÓN

La importancia de reconocer e informar las formas L radica en que su presencia en los pacientes está infradiagnosticada, ya que clínicamente son poco conocidas y se pueden confundir fácilmente con otros elementos en el sedimento de orina. En la visualización al microscopio óptico presentan una morfología muy llamativa con alargamientos exagerados y presencia de abultamientos y deformaciones. Los defectos de la pared se manifiestan como pequeñas protuberancias a lo largo de la célula dándoles un aspecto arrosariado cuando la lesión es heterogénea o como un engrosamiento general de la bacteria, que le confiere un aspecto fusiforme cuando la lesión de la pared es difusa. Estas imágenes se pueden confundir fácilmente con estructuras miceliales o levaduriformes, realizando el diagnóstico diferencial en este caso con la tinción Gram; ya que las levaduras son Gram positivas y estas formas son Gram negativas (17).

CONCLUSIONES

Para poder reconocer e identificar correctamente las formas L es muy importante la experiencia y formación del observador, puesto que son formas fácilmente confundibles con levaduras. Para ello, es fundamental que los TSLCB conozcan estas formas de resistencia y en el caso de sospechar su presencia poder realizar el diagnóstico diferencial con las levaduras.

Al tratarse de formas de resistencia producidas generalmente por antibióticos que actúan sobre la pared celular como los beta-lactámicos, se debe informar siempre al médico clínico de su presencia, ya que orienta a sospechar que el paciente está siendo tratado con un antibiótico ineficaz y la necesidad de cambiarlo.

Es fundamental llegar al diagnóstico de certeza de estas formas L para evitar que la resistencia de esta bacteria aumente, ya que queda en reservorio pudiendo así transmitirse a la comunidad. Es necesario tenerlas en cuenta, puesto que *E. Coli* está incluido en la lista de la OMS como patógeno prioritario en la resistencia a antibióticos, para los que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos.

La ventaja de reconocerlas en el sedimento de orina es que adelanta el diagnóstico de estas formas de resistencia facilitando al médico clínico el cambio de antibiótico y considerarlo para posteriores tratamientos antibióticos..

Contribución de los autores

Todos los autores aceptan la responsabilidad sobre la totalidad de lo contenido en el manuscrito enviado, habiendo aprobado la totalidad de ellos su presentación.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún interés comercial ni asociativo que presente un conflicto de intereses con el manuscrito presentado.

REFERENCIAS

1. Typas A, Banzhaf M, Gross CA, Vollmer W. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol.* 2011;10:123-36.
2. Allan EJ, Hoischen C, Gumpert J. Bacterial L-forms. *Adv Appl Microbiol.* 2009;68:1–39.
3. Mercier R, Kawai Y, Errington J. General principles for the formation and proliferation of a wall-free (L-form) state in bacteria. *eLIFE* 2014;3:E04629.
4. Klieneberger E. The natural occurrence of pleuropneumonia-like organisms in apparent symbiosis with *Streptobacillus moniliformis* and other bacteria. *J Pathol Bacteriol.* 1935;40:93-105.
5. Kawai Y, Mickiewicz K, Errington J. Lysozyme counteracts β -Lactam antibiotics by promoting the emergence of L-form bacteria. *Cell.* 2018;172(5):1038-49.
6. Errington J. Cell wall-deficient, L-form bacteria in the 21st century: a personal perspective. *Biochem Soc Trans.* 2017;45:287-95.
7. Maisonneuve E, Gerdes K. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell.* 2014;157(3):539-48.
8. Onwuamaegbu ME, Belcher RA, Soare C. Cell wall-deficient bacteria as a cause of infections: a review of the clinical significance. *J Int Med Res.* 2005;33(1):1-20.
9. Simmering JE, Tang F, Cavanaugh JE, Polgreen LA, Polgreen PM. The increase in hospitalizations for urinary tract infections and the associated costs in the United States, 1998–2011. *Open Forum Infect Dis.* 2017(1);4:1-7.
10. Rowe TA, Juthani-Mehta M. Diagnosis and management of urinary tract infection in older adults. *Infect Dis Clin North Am.* 2014;28(1):75-89.
11. Domingue GJ, Schlegel JU. The possible role of microbial L-forms in pyelonephritis. *J Urol.* 1970;104(6):790-8.
12. Errington J, Mickiewicz K, Kawai Y, Wu LJ. L-form bacteria, chronic diseases and the origins of life. *Philos. Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2016;371(1707): 20150494.
13. Mickiewicz KM, Kawai Y, Drage L, Gomes MC, Davison F, Pickard R, et al. Possible role of L-form switching in recurrent urinary tract infection. *Nat Commun.* 2019;10(1):4379. Erratum in: *Nat Commun.* 2019;10(1):5254.
14. Wolf AJ, Underhill DM. Peptidoglycan recognition by the innate immune system. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(4):243-54.
15. La OMS publica la lista de bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. [citado 9 de diciembre de 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
16. Jorgensen I, Seed PC. How to make it in the urinary tract: a tutorial by *Escherichia coli*. *PLOS Pathog.* 2012;8(10): e1002907.
17. Jimenez JA, Ruiz G. El Laboratorio Clínico 2: Estudio de los elementos formes de la orina. Estandarización del sedimento urinario. LABCAM, 2010. Disponible en: https://www.abm.org.ar/docs/campanas/erc/Estandarizacion_del_sedimento_urinario.pdf