

Uretritis producida por un *Neisseria* penicilino resistente con caracteres distintos al *Neisseria gonorrhoeae*

Por NÉSTOR MORALES VILLAZÓN
y RICARDO A. MARGNI

La capacidad de diversos gérmenes sensibles, de resistir a la acción de la penicilina, ha sido ampliamente comprobada. Son las infecciones debidas al estáfilo y al gonococo, las que particularmente se han destacado en este sentido.

Abraham y colaboradores, Schnitzer y los suyos, McKee y Rake, y finalmente Frisch, han logrado, "in vitro", acrecentar varios cientos de veces dicha capacidad. Cepas de *Staphylococcus aureus* y de *Neisseria gonorrhoeae* paulatinamente habituadas a dosis crecientes, han sobrevivido a concentraciones del antibiótico que en condiciones normales habrían inhibido todo cultivo.

Respecto a lo que ocurre "in vivo", las investigaciones de Schit, Sesler, Furthmore, Rammelkamp y Maxon, con cepas de estafilococos y neumococos, son muy demostrativas y prueban que los microorganismos patógenos son capaces de resistir, por hábito adquirido, a dosis que en otras condiciones les habrían sido fatales.

El hecho de tener en nuestras manos dos cepas de *Staphylococcus aureus* y una de presunto gonococo, resistentes a las sulfamidas y penicilina, tanto "in vivo" como "in vitro", nos permiten presentar este trabajo, que en breve completaremos con otros.

Debemos, antes de entrar en materia, mencionar la opinión de Miller (J. A. M. A., 1947. 135-749), que afirma que el pretendido acostumbramiento a la penicilina por parte de algunos gérmenes, es más aparente que real, y que todo reside en una cuestión de dosis, es decir, que afecciones que no ceden a cantidades pequeñas o moderadas, son dominadas por dosis masivas. Esta opinión que transcribe la "Semana Médica" de Buenos Aires en el editorial correspondiente al 1º de abril del año en curso, es compartida por algunos autores, si bien está en abierta contradicción con lo dicho anteriormente.

El material objeto de este trabajo lo aislamos de un enfermo, cuya historia clínica, por conceptuarla de importancia, la resumimos en algunas líneas. J. L., italiano, casado, 38 años de edad, con cuatro

Presentado en la reunión de comunicaciones del 2 de noviembre de 1948.

de residencia en el país, contrae en abril de 1945 una uretritis aguda. Examinado al cuarto día de la enfermedad, observamos al nivel del meato abundante secreción purulenta. Los preparados dejan ver, tanto intra como extracelular, un diplococo Gram negativo, con los caracteres morfológicos del gonococo de Neisser. Se diagnostica blenorragia aguda.

El especialista que lo atendía, le prescribe de inmediato un millón de unidades Oxford de penicilina cristalizada, en inyecciones intramusculares a la dosis de 50.000 unidades cada cuatro horas. Además, le ordena comprimidos de sulfanilamida en dosis elevada.

Al mes volvemos a examinarlo y encontramos que la secreción, si bien en menor cantidad, es aún bastante apreciable. Nos informa que le han aplicado nuevas series de inyecciones de penicilina. Los preparados muestran diplococos Gram negativos intra y extracelulares. Desde aquella fecha y por más de dos años, lo hemos atendido regularmente cada dos o tres meses. El pus continuaba fluyendo, si bien en muy pequeña cantidad, e invariablemente contenía diplococos tipo Neisseria. Finalmente, en febrero del año en curso, efectuamos, a su pedido, un espermocultivo. En dicha oportunidad, sólo encontramos vestigios de secreción purulenta al nivel de la uretra anterior. Los cultivos sobre placas con agar ascitis, fueron incubados a 37°C, por 48 horas. Se observó desarrollo de tres tipos de colonias diferentes: las primeras muy abundantes de *Staphylococcus albus*, en menor cantidad otras de un bacilo difteromorfo y, finalmente, escasas de un diplococo Gram negativo, que daba reacción positiva de oxidadas (solución acuosa de clorhidrato de dimetil-para-fenilendiamina al 1 %). Se eligieron para su estudio las tres colonias que presentaron la más intensa reacción de las oxidasas. Todas resultaron iguales.

Con esta cepa se pensaba efectuar únicamente ensayos sobre penicilino resistencia "in vitro", pero al observar en ella algunas anomalías, tales como: desarrollo en agar simple, producción de colonias más opacas que las del gonococo, fermentación de glucosa, maltosa, sacarosa, levulosa, etc., se decidió hacer un estudio bacteriológico completo de la misma.

El único antecedente bibliográfico hallado fué la cita que Colle y Lloyd hacen en el "Journal of Pathology and Bacteriology", 1917, 21, 267 (citado por Arseno en la "Prensa Médica Argentina", 1941, n° 10, tomo XXVIII), quienes al estudiar los medios de cultivo para el gonococo dicen haber aislado de pus uretral, un diplococo Gram negativo semejante al *Neisseria gonorrhoeae*, que desarrollaba en agar ordinario y que fermentaba sacarosa y maltosa; pero en la comunicación original, no se informa si dicho germen fué estudiado en particular.

Por el momento se ha designado al microorganismo aislado por nosotros con el nombre de "Neisseria P. R.", dada su penicilino resistencia "in vivo", y el estudio bacteriológico efectuado, es el que se detalla a continuación.

NEISSERIA "P. R."

Habitación: Hasta el presente sólo puede decirse que su lugar de alojamiento es la uretra y genitales masculinos, ya que se lo ha aislado de pus uretral y líquido espermático.

Morfología: Cocos redondos u ovales, de $0,6 \times 0,8 \mu$ de diámetro, agrupados generalmente de a dos, en forma de riñones o granos de café, adosados por la cara cóncava, y con el eje del coco normal al que forman los dos. Carece de cápsula y no forma esporas; es inmóvil, no toma el Gram, no es ácido resistente.

Exigencias germinales y metabólicas: No requiere para su crecimiento albúminas nativas, sangre, suero, ascitis ni factores especiales (X o V). Tampoco necesita **azúcares**.

Es aerobio estricto. No desarrolla en anaerobiosis ni en ambiente con baja tensión de oxígeno. No desarrolla en el medio de Tarozzi, y en el medio de Veillon, sólo crece hasta 3-4 mm. de profundidad de su superficie libre. En ambientes con 10 % de anhídrido carbónico da desarrollo abundante.

Puede cultivarse igualmente a 37°C y a temperatura ambiente. Sus límites de crecimiento son 18°C, y 40°C, siendo la temperatura óptima 37°C. No crece en medios donde la única fuente de carbono es el citrato de sodio y la de nitrógeno, el fosfato amónico sódico, razón por la que no cultiva en el medio de Koser.

El pH óptimo para su crecimiento es 7,2 a 7,6.

Características de cultivo: Agar simple-placa (24 horas): Colonias redondas, húmedas, de borde seguido, de 0,5 a 1 mm. de diámetro, ligeramente elevadas, de color gris azulado. Se emulsionan fácilmente.

Después de más de treinta repiques las colonias conservan la morfología de tipo "S", pero la reacción de Alessandrini, Pampana y Sabatucci (tripaflavina 1/500), tanto en las muestras tomadas en los primeros repiques, como la de los últimos, da positiva. Como esta reacción es positiva en los gérmenes en fase "R", y también en aquellas bacterias con antígeno Vi, se buscó la presencia de este antígeno con suero antiVi, pero con resultado negativo.

Agar simple-placa (96 horas): Colonias semejantes a las anteriores, algo más grandes, pero más compactas y con la parte central de aspecto cremoso.

Agar simple estría: Desarrollo abundante a las 24 horas, mostrando el cultivo un ligero reflejo verdoso.

Agar ascitis-placa (24 y 96 horas): Desarrollo semejante al observado en agar ordinario.

Agar ascitis-estría: Desarrollo abundante a las 24 horas.

Agar sangre-placa (24 y 96 horas): Desarrollo semejante al observado en agar simple.

Agar sangre-estría: Como en agar simple.

Medio de Löffler: Colonias pequeñas, de 0,5 a 1 mm. de diámetro, semejantes a las observadas en agar simple a las 24 horas.

Agar Fildes: Como en agar simple.

Papa simple: Desarrollo poco visible debido a su color blanquecino, de aspecto cremoso.

Gelatina estría: Como en agar simple.

Gelatina punción: Desarrollo filiforme; no la licúa.

Caldo peptonado: Enturbiamiento uniforme con producción de ligera película y anillo. No produce collar; no da grumos. Ligero depósito que se eleva por agitación.

Caldo suero: Como en caldo peptonado.

Caldo ascitis: Como en caldo peptonado.

Resistencia: Sembrado en agar simple o agar ascitis, permanece vivo a 37°C o a temperatura ambiente seis o siete días. Si las siembras se hacen en agar sangre, su vitalidad se prolonga por dos o tres días más. Desechado y en vacío fosfórico, se conserva vivo por mucho tiempo.

Su desarrollo es inhibido por:

Fenol al uno por mil.

Formol (solución de aldehído fórmico al 40 %) al 0,4/1000.

Bicloruro de mercurio al 0,1/1000.

Sulfatiazol sódico "Squibb" (2sulfanilil amino tiazol sódico sesquihidratado) al 4/1000.

Penicilina "Emesta" 0,5 unid. Oxford por ml. (Siembras practicadas en caldo peptonado).

El calor húmedo a 60°C mata a los gérmenes sembrados en caldo en 7 minutos.

El calor húmedo a 50°C mata a los gérmenes sembrados en caldo en 40 minutos.

Reacciones bioquímicas: Al igual que las otras especies del género *Neisseria*, el desarrollo es inhibido por el telurito de potasio, y a ello se debe que no cultive en el medio de Horgan y Marshall. Tampoco desarrolla en el medio de MacConkey líquido, porque las sales biliares lo inhiben.

A la leche simple y tornasolada no las modifica; no produce indol ni ácido sulfhídrico. No forma amoníaco, no reduce los nitratos a nitritos.

La reacción de Voges Proskauer es negativa, y la del rojo de metilo positiva débil. La reacción de las catalasas es francamente

GÉNERO NEISSERIA

BACTERIA	Coloración de gram	Germinación en agar	Germinación a 22°C	Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Levulosa	Lactosa	Observaciones
<i>Neisseria meningitidis</i>	—	±	—	A	A	—	—	—	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	—	—	—	A	—	—	—	—	
<i>Neisseria</i> "P. R." ...	—	+	+	A	A	A	A	—	
<i>Neisseria pharyngis</i> <i>sicca</i>	—	+	+	A	A	A	A	—	
<i>Neisseria catarrhalis</i>	—	+	+	—	—	—	—	—	Autoaglutina- ble
<i>Neisseria flava</i> I ...	—	+	+	A	A	—	A	—	
<i>Neisseria flava</i> II ...	—	—	—	A	A	A	A	—	
<i>Neisseria flava</i> III ...	—	±	±	A	A	—	—	—	
<i>Diplococcus mucosus</i>	—	+	+	?	?	?	?	?	
<i>Diplococcus crasus</i> ...	±	+	+	A	A	A	A	A	
<i>Neisseria flavescens</i>	—	+(1)	?	—	—	—	—	—	

(1) Germinación en agar semisólido.

positiva; la reacción de oxidasas con solución acuosa al 1 % de clorhidrato de dimetil para-fenilendiamina es positiva muy débil al comienzo, pero luego se intensifica. La reducción del azul de metileno es negativa.

No produce autolisinas, y a ello se debe la ausencia de formas gigantes en los cultivos viejos, cosa muy común en el *Neisseria gonorrhoeae*.

No es autoaglutinable en solución fisiológica, a diferencia de la mayoría de las *Neisserias* que pululan en las vías respiratorias superiores.

No produce enzimas capaces de digerir el suero coagulado.

Fermenta intensamente con producción de ácido, pero no de gas, a la levulosa, algo menos la sacarosa y maltosa, siendo menos intensa la fermentación de la glucosa, lo que explica el porqué de la reacción del rojo de metilo positiva débil. No fermenta lactosa, arabinosa, galactosa, inulina, manita, ramnosa, salicina e inosita.

Después de cuarenta pasajes por agar sangre, fermenta los mismos azúcares y con igual intensidad.

Estructura antigénica

El suero aglutinante preparado en conejos mediante inoculaciones de tres dosis de gérmenes muertos por formol (5.000 millones por cm.³) y en la proporción de 0,5 cm.³, 2 cm.³ y 2,5 cm.³ respectivamente por vía subcutánea y con intervalo de una semana, y una última inoculación de 4 cm.³ de gérmenes vivos, por vía intraperitoneal, a la misma concentración por cm.³ que las anteriores, permitió obtener, una semana después de la última inoculación, un suero aglutinante de título 1/12.800.

Se practicó la prueba de aglutinación cruzada (*Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria P. R.*) con el siguiente resultado:

Bacteria	Suero aglutinante	Título aglutinante máximo
<i>Neisseria P. R.</i>	Anti <i>Neisseria P. R.</i>	1/12.800
<i>Neisseria P. R.</i>	Anti <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1/16
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Anti <i>Neisseria P. R.</i>	1/2
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Anti <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1/50

De acuerdo a lo anterior, se concluye que el *Neisseria P. R.* tiene un antígeno de grupo que comparte con el *Neisseria gonorrhoeae*.

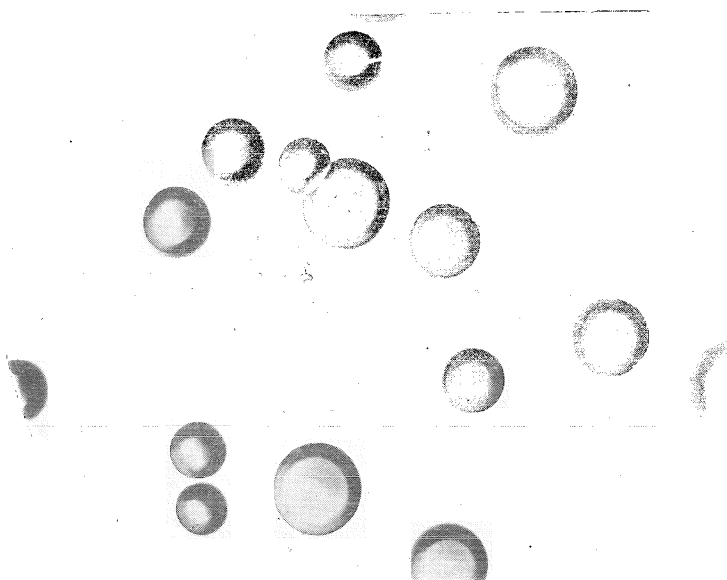


FIG. 1. — Conjunto de colonias de *Neisseria gonorrhoeae*. Agar ascitis, 48 horas a 37°C.

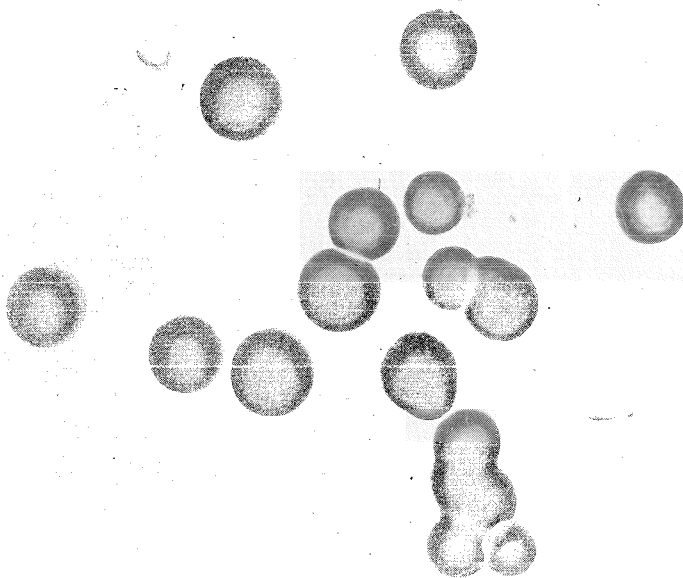


FIG. 2. — Conjunto de colonias de *Neisseria* "P.R.". Agar ascitis, 48 horas a 37°C.

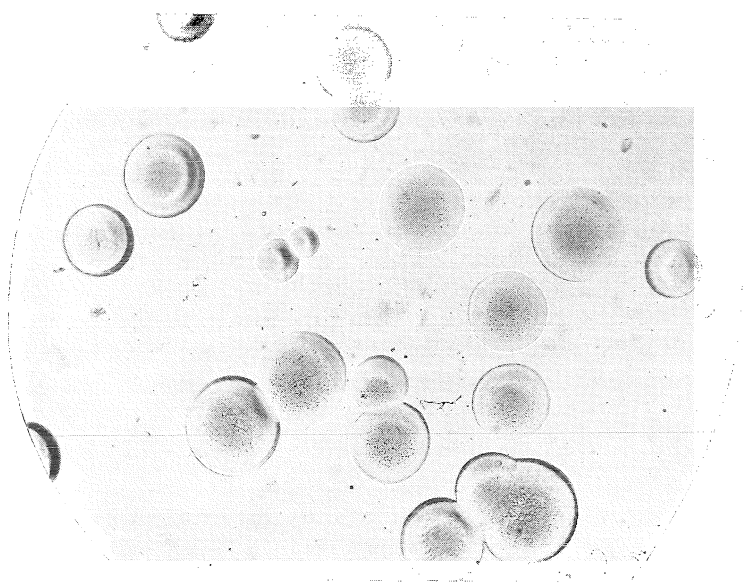


FIG. 3. — Conjunto de colonias de *Neisseria gonorrhoeae*. Agar ascitis. Seis días a 37°C.

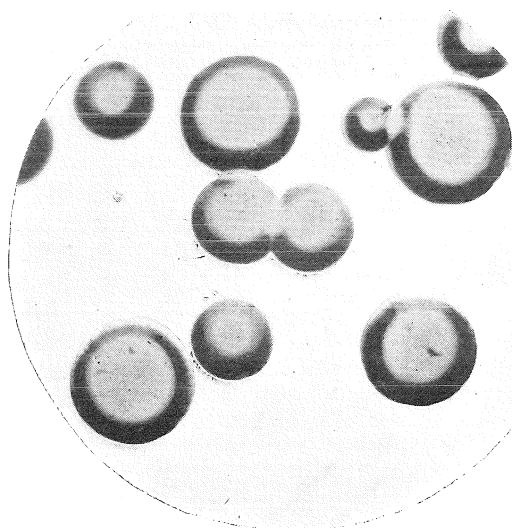


FIG. 4. — Conjunto de colonias de *Neisseria* "P.R.". Agar ascitis. Seis días a 37°C.

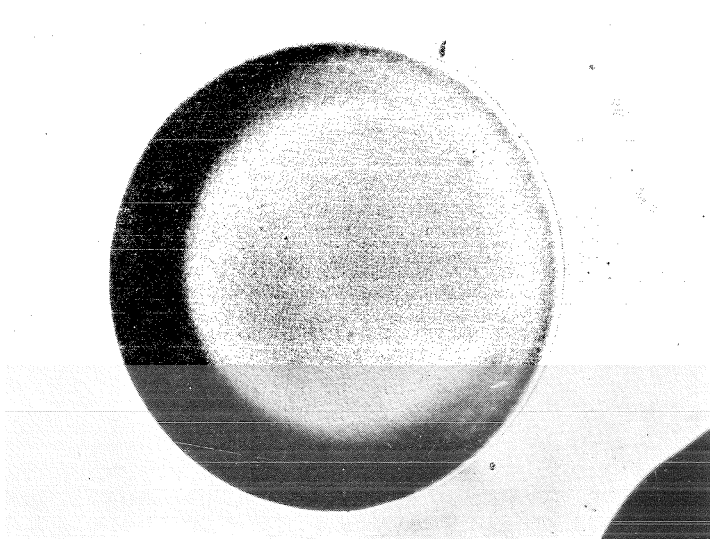


FIG. 5. — Colonia aislada de *Neisseria gonorrhoeae*. Agar ascitis.
48 horas a 37°C.

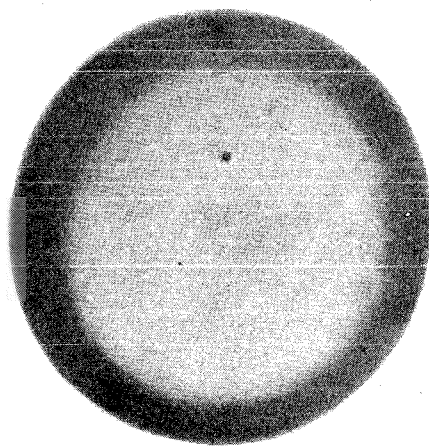


FIG. 6. — Colonia aislada de *Neisseria* "P.R.". Agar ascitis.
48 horas a 37°C

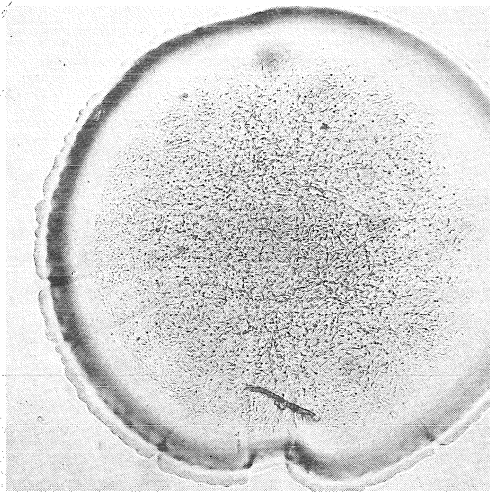


FIG. 7. — Colonia aislada de *Neisseria gonorrhoeae*. Agar ascitis. Seis días a 37°C.

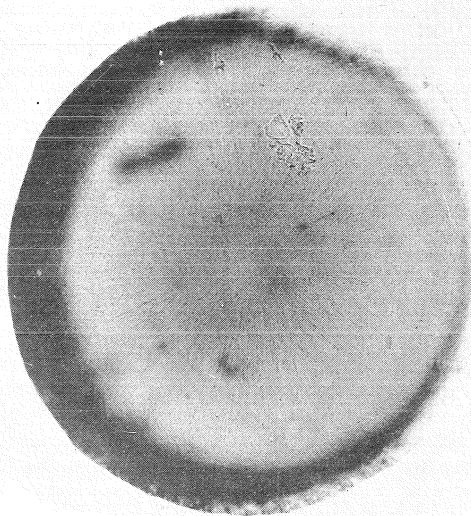


FIG. 8. — Colonia aislada de *Neisseria* "P.R.". Agar ascitis. Seis días a 37°C.

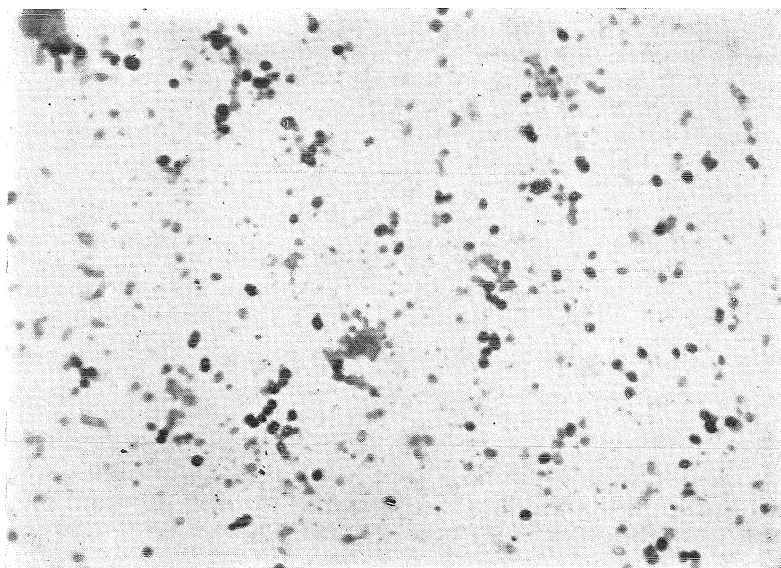


FIG. 9. — *Neisseria gonorrhoeae*. Se observan algunas formas gigantes e imágenes microbianas difusas, como resultado de la autólisis. De un cultivo en agar ascitis de 48 horas.

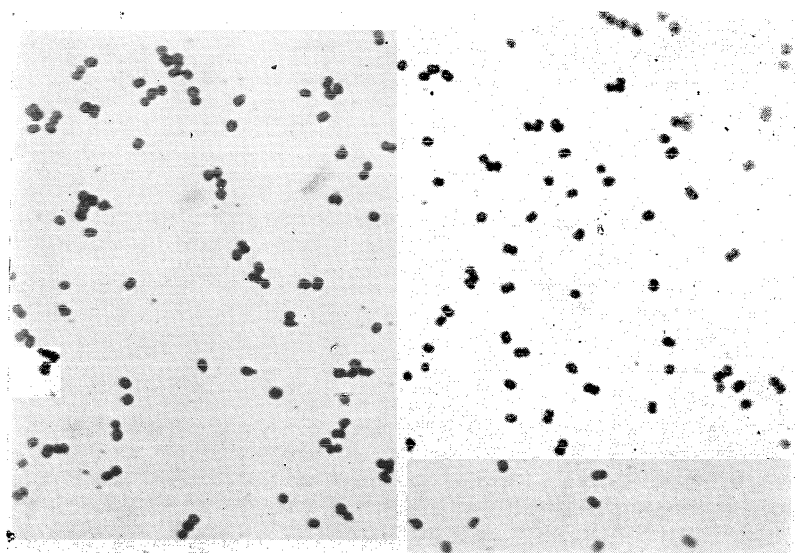


FIG. 10. — *Neisseria* "P.R.". No se observan formas gigantes. De un cultivo en agar ascitis de 48 horas.

PATOGENIA

No produce hemolisinas ni toxinas necrosantes.

Con suspensiones de *Nisseria P. R.* en solución fisiológica, procedentes de siembras en agar ascitis, se inocularon lauchas, cobayas y conejos por vía subcutánea, intraperitoneal y endovenosa, con el siguiente resultado:

Lauchas: Por vía subcutánea no se observó lesiones orgánicas ni infartos ganglionares. En el punto de la inoculación no se observó lesiones. Por vía intraperitoneal y endovenosa, ausencia de lesiones orgánicas y líquidos de derrame. Hemocultivos (por punción cardíaca) negativos.

Cobayas y conejos: Los resultados fueron análogos a los observados en lauchas. Con la misma suspensión bacteriana se inoculó cobayos por vía intraocular e intravaginal, sin que los animales mostraran la presencia de procesos infecciosos.

CONCLUSIONES

1º — Si bien por los fenómenos de fermentación, el germen denominado por nosotros *Neisseria P. R.* coincide con *Neisseria pharyngis sicca*; por las demás reacciones en los medios de cultivo, el lugar en el que de ordinario se encuentra y la clase de lesiones que provoca en el hombre, no entra en ninguna de las especies conocidas del género *Neisseria*.

2º — De acuerdo con el estudio efectuado, probablemente se trata de un germen perteneciente al género *Neisseria* no clasificado hasta el presente; lo que se debería a que muchos de los exámenes bacteriológicos de las secreciones sospechosas, se hacen únicamente por cultivo en agar ascitis u otros medios adecuados y por la reacción de las oxidasas sobre las colonias. El hecho de que en tales condiciones la similitud entre dichas especies sea muy grande (sobre todo en las primeras 24 horas) parecería demostrar: o que se trata de una especie nueva de *Neisseria* o bien, de una variación por influjo del *Neisseria gonorrhoeae*, provocada por el tratamiento intenso a que fué sometido el enfermo con sulfanilamidas y penicilinas. Esto explicaría también el cambio sufrido en su constitución antigénica y el comportamiento frente a los sueros anti *Neisseria gonorrhoeae*, anti *Neisseria P. R.* y las otras anomalías de la cepa. Esta última interpretación es menos factible que la primera, pues cuando Colle y Lloyd estudiaron la cepa anómala, el tratamiento de la blenorragia por las sulfanilamidas y la penicilina era en absoluto desconocido.

BIBLIOGRAFÍA

- ABRAHAM, E. P.: *Lancet*, 2-21, 1941.
ARSENIO CARRANZA, M.: *La Prensa Méd. Argentina*, nº 10, T. XXVIII, 1941.
BERGEY: *Manual of Determinative Bacteriology*, 1939.
COLLE y LLOYD: *Journ. of Pathology and Bacteriology*, 21-267, 1917.
FRISCH, A. W.: *Am. Journ. Syph. Contr. and Ven. Dis.*, 28-267, 1944.
MCKEE, C. M.: *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 51-275, 1942.
SCHNITZER, R. J.: *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 53-353, 1948.
Semana Médica, La: nº 14-557, 1948.
SORDELLI, A., MIRAVENT, J. M., y NEGRONI, P.: *Rev. Inst. Bact., Bs. As.*, 1926.
TOPLEY y WILSON: *Bacteriología e Inmunidad*, 1943.