

Sección: Artículos originales

Comparación de medios y métodos para el aislamiento e identificación de *Neisseria gonorrhoeae*¹

Fabio Carmona, M.Sc²

Marlene Hernández de Duque, M.Sc³

Gladys Domínguez O., Bact⁴

Eunice Ramírez de Alvarez, Bact⁴

Rodrigo Rodríguez, M.D.⁵

RESUMEN

Para conocer el estado actual de la blenorragia en grupos de alto riesgo, se midió la prevalencia de *Neisseria gonorrhoeae* en 214 mujeres de las que asisten al centro de Salud del Barrio Obrero de la ciudad de Cali, Colombia, al control de enfermedades sexualmente transmisibles. La medición se hizo por medio de dos métodos: 1) la prueba enzimática conocida como Gonozyne[®] que descubre el antígeno gonocócico, demostró una prevalencia de 19.3%; 2) el cultivo en tres medios diferentes: el agar Thayer-Martin modificado, Thayer-Martin tradicional y agar chocolate con VCN. En el primer medio se obtuvieron 48 aislamientos, es decir, una prevalencia de 22.4%. De las 48 cepas aisladas, 13 (27.1%) produjeron betalactamasa.

La gonorrea continúa siendo un grave problema de salud pública, por la cantidad de casos asintomáticos, especialmente en la mujer. Un sistema que descubra 100% de

los pacientes que tienen la infección por *Neisseria gonorrhoeae* (NG), sería deseable por la importancia clínica y epidemiológica de la enfermedad, pero la falla radica en la pérdida de la viabilidad del microorganismo por no usar medios de transporte adecuados y por la dificultad que tienen los laboratorios en conseguir los elementos necesarios para preparar un buen medio de cultivo que permita el aislamiento primario, especialmente de sitios contaminados como el endocervix humano. Debido a esto se ha producido una serie de medios de transporte como el Amies y medios que sirven de transporte y crecimiento (Transgrow, láminas Go de Roche), así como la modificación del tradicional medio de Thayer Martin¹, en el sentido de adicionarle antibióticos y antimicóticos que frenen con mayor eficiencia los microorganismos acompañantes.

Las pruebas enzimáticas (ELISA-Gonozyne[®]), la fluorescencia directa, la caracterización de bandas de ADN, todas con cifras relativamente altas de sensibilidad que fluctúan entre 93.0% y 97.9%²⁻⁵, son técnicas para agilizar y mejorar el diagnóstico. Sin embargo, la consecución de estos elementos muchas veces se hace difícil por el costo mismo y por las dificultades inherentes a los trámites de importación. El problema concluye en que la vigilancia epidemiológica se limita a un examen directo por Gram, como único instrumento para identificar la enfermedad. Otro de los problemas encontrados en esta práctica es la dificultad que tienen algunos laboratorios para reconocer la bacteria, al emplear el medio tradicional de fermentación de carbohidratos.

1. Trabajo financiado por la Universidad del Valle, el Laboratorio de Salud Pública Departamental y los Laboratorios Abbott.
2. Profesor Titular, Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
3. Unidad Regional de Salud de Cali, Colombia.
4. Laboratorio de Salud Pública Departamental, Cali, Colombia.
5. Epidemiólogo, Unidad Regional de Salud de Cali, Colombia.

En el presente trabajo, realizado en la ciudad de Cali, Valle, Colombia, se midió la prevalencia de NG en un grupo de mujeres que asisten al Centro de Salud del Barrio Obrero, al control de enfermedades sexualmente transmisibles. Se compararon tres medios de cultivo y la prueba enzimática de Gonozyne® (Abbott) para el diagnóstico, lo mismo que 2 técnicas de fermentación de carbohidratos para identificar las especies de *Neisseria*⁶. También se midió el porcentaje de cepas productoras de beta-lactamasa.

MATERIAL Y METODOS

Grupo de estudio. Las personas estudiadas asistían al Centro de Salud del Barrio Obrero de la ciudad de Cali a la consulta de enfermedades transmisibles sexualmente. En distintos días de la semana se eligieron al azar 214 mujeres que se examinaron mediante 2 métodos: la prueba enzimática conocida como Gonozyne® que se comparó con el cultivo tradicional, realizado en 3 medios diferentes.

Se utilizó Gonozyne® solamente en 93 de las 214 mujeres, debido a limitaciones económicas y además, porque no se observaron variaciones en la prevalencia de la blenorragia al comparar el primer grupo de 100 con las siguientes 100 personas. A las pacientes examinadas con Gonozyne® se les hizo una encuesta para obtener datos epidemiológicos y se practicó además una observación minuciosa del estado físico del cuello uterino.

El material se obtuvo directamente del cuello uterino mediante un escobillón de dacrón. La primera muestra se destinó al cultivo en agar y al examen directo por Gram. Se tomó una segunda muestra con el escobillón que suministra el Gonozyne®, previa limpieza del cuello uterino, según recomiendan los fabricantes del producto.

Proceso de la muestra

1. Examen directo. Por coloración de Gram para establecer comparación con los otros 2 procedimientos y observar la presencia o no de reacción leucocitaria.

2. Cultivo. Se hizo en agar Thayer-Martin modificado, por la adición de anfotericina B 2 mg/l y lactato de trimetoprim 5 mg/l, para inhibir los hongos resistentes a la nistatina y las cepas de *Proteus*, contaminantes comunes de este sitio corporal. También la muestra se sembró en Thayer-Martin tradicional y agar chocolate con vancomicina-colisticina-nistatina (VCN), usando el agar tripticasa como base y sangre de cordero al 7% para

enriquecer más el medio. El cultivo se llevó a cabo según la metodología establecida y la identificación se hizo con la prueba de oxidasa y las reacciones de fermentación en agar-cisteína-tripticasa (ACT) modificado⁶ y ACT blando. La modificación del ACT consistió en adicionar agar para conseguir una concentración final de 1.5% y la del azúcar hasta 2%; el medio se preparó con la superficie inclinada. A todas las cepas se les practicó la prueba de beta-lactamasa con el reactivo de nitrocefín. Se usaron como controles positivos *Haemophilus influenzae* tipo b y *Staphylococcus aureus*.

3. Gonozyne®. Esta técnica, cuyo principio activo consiste en demostrar antígeno gonocócico en frotis uretral o en conducto cervical, se lleva a cabo mediante una prueba inmunoenzimática de fase sólida. Se aplicó tan sólo a 93 de las 214 pacientes, pues había ciertas limitaciones económicas y, además, porque no se observaron variaciones en la prevalencia de la blenorragia cuando se comparó el primer grupo de 100 con las siguientes 100 personas examinadas.

RESULTADOS

Del grupo estudiado, 64% estaban en la tercera década de la vida, con promedio de edad de 28 años, desviación estándar de 6.4 años y una mediana de 27.

Se obtuvieron 48 cultivos de NG en el agar Thayer-Martin modificado, de las 214 pacientes examinadas, para una prevalencia de 22.4%. Este fue el medio que suministró los máximos resultados, pues la adición de anfotericina B y lactato de trimetoprim inhibieron el crecimiento de *Candida albicans* y *Proteus* sp, respectivamente, gérmenes que son comunes en el tracto genital femenino. En los otros medios empleados el comportamiento de las 48 cepas fue similar, con excepción de 3 cultivos contaminados con *Proteus* sp.

Cuadro 1
Comparación de la Prueba Gonozyne® con el Cultivo Thayer-Martin

Gonozyne®	Thayer-Martin		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	13	5	18
Negativo	7	68	75
Total	20	73	93

X²McNemar = 0.08 NS Sensibilidad 13/20 x 100= 65%
Especificidad 68/73 x 100= 93.2%

A todas las 48 cepas aisladas se les midió la capacidad para producir beta-lactamasa, y se obtuvo un porcentaje de resistencia a la penicilina de 27.1% (13/48). Al comparar la positividad de NG en las 93 personas examinadas por ambos métodos, se encontró 19.3% y 21.5% para Gonozyne® y cultivo, respectivamente.

El Cuadro 1 muestra concordancia de resultados entre el cultivo y la prueba de Gonozyne®. La sensibilidad para Gonozyne® fue 65% y la especificidad, 93.2%.

Se encontró un valor predictivo de la prueba positiva de 72.2%, considerado como aceptable, mientras que el valor predictivo de la prueba negativa fue 9.3%, relativamente bueno. La prueba pareada de McNemar mostró que no hay diferencias estadísticamente significantes entre ambos tipos de exámenes, lo cual hace pensar que se pueden emplear indistintamente, con resultados similares en este grupo de población.

Al utilizar la información contenida en el formulario diligenciado a las 93 pacientes sometidas a ambas pruebas diagnósticas, se hicieron los análisis estadísticos y se observó que la edad, la frecuencia de relaciones sexuales y aun la presencia de síntomas no contribuían a que hubiera diferencia estadísticamente significativa entre ambas pruebas.

DISCUSION

La blenorragia está dentro de las principales enfermedades de transmisión sexual. Su forma sintomática en algunos casos se diagnostica clínicamente con facilidad. Las formas distorsionadas y las asintomáticas son las que en realidad se han constituido en un problema de salud pública.

Se han ensayado varias técnicas de laboratorio para confirmar la impresión clínica y se concluyó que la coloración de Gram, el cultivo y aun las pruebas enzimáticas fallan. Esto hace pensar que hasta no descubrir un método que ofrezca 100% de sensibilidad y especificidad, el diagnóstico se mejorará al combinar los sistemas existentes. En orden de complejidad, el diagnóstico se ha llevado a cabo por medio de la tradicional coloración de Gram, que ha establecido su valor cuando permite observar diplococos Gram negativos intracelulares y hay reacción leucocitaria abundante; sus limitaciones consisten básicamente en la subjetividad que en un momento dado puede imprimir el microscopista, cuando examina muestras provenientes de personas expuestas a alto riesgo. También es frecuente confundir *Neisseria* con *Acinetobacter* sp,

microorganismo que se puede encontrar en la región genital, pues se aísla con frecuencia en casos de infección urinaria; pero tal vez la mayor limitación del examen directo consiste en que no permite demostrar la viabilidad del microorganismo y la capacidad para producir beta-lactamasa.

El cultivo, que es el mejor método en sensibilidad y especificidad conocido hasta ahora⁷, también tiene limitaciones diagnósticas y es de difícil ejecución en ciertos tipos de laboratorios. La falta de experiencia que permite la desecación en el manejo de la muestra clínica, disminuye en un porcentaje bastante alto la posibilidad de aislar el microorganismo. Las deficiencias en el transporte y un inadecuado suministro de CO₂, también afectan la viabilidad del germen.

El frecuente error de algunos laboratorios al creer que todo lo que crece en agar Thayer-Martin y da positiva la prueba de oxidasa es NG, es otra causa de falla en el diagnóstico. La única prueba que permite identificar la NG es la fermentación de los azúcares, además de otras más complejas, como la caracterización de las bandas de ADN, la fluorescencia directa y las pruebas enzimáticas para demostrar el antígeno gonocócico.

La prueba de fermentación, otro de los escollos encontrados por los laboratorios de rutina, se hizo en el medio ACT modificado⁶. El olvido de la medición de pH y su posterior ajuste a 7.3 U es tal vez la explicación por la cual casi todos los laboratorios argumentan que esta prueba es compleja y no les funciona a satisfacción. En el presente estudio, las 48 cepas aisladas se identificaron con la técnica del ACT modificado y del ACT blando; se alcanzó una correlación de 100%, pero fue más fácil la interpretación con el procedimiento modificado.

Pero como el problema de salud pública sigue vigente, se ensayan nuevos métodos diagnósticos que den agilidad y precisión, p.e. la prueba enzimática Gonozyne®, cuyo principio biológico consiste en unas esferas tratadas con un anticuerpo (Ac) contra NG, que sirve de unión al antígeno (Ag) que se espera encontrar en la muestra clínica (secreción uretral, endocervical, anal, etc). Posteriormente, este complejo esfera-Ac-bacteria se pone en contacto con un conjugado constituido por un Ac unido a una enzima, la peroxidasa de rábano. La presencia de la enzima en la superficie de la esfera se determina al incubar todo el sistema en un sustrato, el orto-fenilendiamina que contiene además una solución amortiguadora de citratofosfatos y peróxido de hidrógeno. La reacción positiva se manifiesta por la presencia de un color anaranjado. La

intensidad de este color es directamente proporcional a la cantidad de Ag de NG fijado a la esfera. La lectura de la prueba se hace con la ayuda de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 495 nm. Los resultados obtenidos con esta prueba enzimática son muy controvertidos. Schater *et al*² la aplicaron a 196 hombres y la compararon con el cultivo, que mostró una prevalencia de 14% de NG, obtuvieron 93% y 99% de sensibilidad y especificidad, respectivamente.

Nasello *et al*⁸ examinaron 119 hombres y 198 mujeres y combinaron las pruebas de Gonozyne®, cultivo y Gram para obtener 89.5% de positividad en hombres y 95.9% en mujeres; encontraron una sensibilidad en Gonozyne® de 88.5% y 99% para hombres y mujeres y una especificidad de 93.5% y 86%, respectivamente, en ambos grupos. Estos autores recomiendan usar todas las pruebas disponibles, para mejorar el diagnóstico.

En el presente estudio se aplicó la prueba enzimática a 93 pacientes de las 214 personas examinadas, y se vieron sensibilidad y especificidad de 65% y 93.2%, respectivamente. La prevalencia de NG fue 19.3%.

El Cuadro 2 indica una comparación de los resultados obtenidos en el presente estudio frente a los de otros autores^{3,4,8,9}. Se puede ver que no hay diferencias estadísticamente significativas. Estos hallazgos y los de otros autores permiten hacer los siguientes comentarios acerca de la prueba enzimática:

1. Se puede usar como prueba filtro en grupos de alto riesgo³.
2. Como puede haber gran cantidad de falsos positivos por existir Ag en el cérvix, no se recomienda en pacientes en tratamiento o en vías de curación¹⁰.
3. Se considera mejor que la prueba de Litmulus¹¹.
4. Debido a que su especificidad es menor de 100%, cuando se usa en poblaciones con baja prevalencia de NG se hace necesario mejorar la prueba.
5. Por tener las limitaciones anteriores no se recomienda en poblaciones de baja prevalencia; se puede emplear combinada con las pruebas tradicionales de Gram y fluorescencia.
6. No ofrece mejores resultados que el tradicional cultivo bacteriano, sobre todo en muestras de canal endocervical⁷.
7. No diferencia cepas productoras de penicilinas.

En el presente estudio se midió la prevalencia de NG empleando 3 medios de cultivo, con la finalidad de comparar los resultados en cada uno de ellos y poder mostrar a

Cuadro 2
Comparación de la Prueba Enzimática con otros Estudios Realizados en Grupos de Alto Riesgo

Autor	Nº pacientes	S	E	Prevalencia de NG
Van Ulsen <i>et al</i> ⁹	266	88	99.2	8.4
Thomas <i>et al</i> ⁴	100	84.2	98.7	19.2
Nasello <i>et al</i> ⁸	119	88.5	89.2	--
Skeels <i>et al</i> ³	355	79.7	97.9	--
Presente estudio	93	65.0	93.2	19.3

los laboratorios que hay alternativas distintas al Thayer-Martin. La prevalencia de 22.4% de NG se logró en el agar Thayer-Martin modificado, donde se aislaron 48 cepas de las 214 pacientes estudiadas.

La conclusión a que se llega es que este es el mejor medio pero como alternativa se puede emplear el agar chocolate preparado con agar tripticasa y sangre de cordero al 7% adicionando además VCN. Aumentar la concentración de sangre a 7%, enriquece más el medio, evita el uso de isovitalex, y reduce los costos y las dificultades que se presentan para conseguir este suplemento.

La susceptibilidad antimicrobiana no es una prueba de rutina que se realiza en los aislamientos de NG. Aunque los gonococos han aumentado su resistencia a la penicilina y a otros agentes antimicrobianos, la tasa de curación en infecciones genitales no complicadas es de 95%, cuando se usa una dosis adecuada de penicilina¹².

En 1976 aparecieron las cepas productoras de beta-lactamasa, importadas de Filipinas a los Estados Unidos⁶; ellas poseen un plasmidio que codifica la producción de la enzima e hidroliza la penicilina. La aparición de estas cepas ha ido en aumento.

Cuadro 3
Aislamiento de NG en Tres Medios de Cultivo

Medios	Resultados			Exámenes realizados
	+	-	contaminados	
Agar Thayer-Martin modif.	48	166	0	214
Agar Thayer-Martin	45	163	3	214
Agar chocolate con VCN	45	163	3	214

A todas las 48 cepas aisladas se les midió la capacidad para producir beta-lactamasa. Esta práctica es importante para propósitos de vigilancia. Existen varios métodos, el acidométrico, el yodimétrico y el de las cefalosporina cromo-génica conocida como nitrocefina.

Como se ha mencionado, al gonococo no se le practica rutinariamente el antibiograma; pero en casos excepcionales se realiza con discos de 10 unidades de penicilina y 100 µg de espectinomicina; el agar empleado es el GC, suplementado con isovitalex al 1%. Los halos de inhibición menores de 20 mm para penicilina, indican resistencia, probablemente debida a la producción de beta-lactamasa; de 20 mm o mayor indica sensibilidad. Para la espectinomicina se considera resistente el halo menor de 14 mm y mayor de 18 mm sensible.

Cuando se requiere antibiograma con otros antibióticos (tetraciclina, cefoxitin, cefotaxime) se recomienda agar-proteosa-peptona N° 3 con hemoglobina e isovitalex, ambos al 1%. La resistencia a la penicilina también puede estar ligada al cromosoma bacteriano⁶. Esta alta prevalencia de cepas resistentes a la penicilina comparada con 4% que informaron otros autores¹³, se puede deber a las siguientes razones:

1. Se realizó con el primer cultivo y no con el cultivo purificado, pues se sabe que la bacteria puede perder el plasmidio que controla esta capacidad con los pases sucesivos⁶.
2. El reactivo con nitrocefina es más sensible que el método yodimétrico, para descubrir beta-lactamasa.
3. Es práctica común en este grupo de personas aplicarse cada mes un benzetil, como medida profiláctica, hecho que podría contribuir a la rápida aparición de cepas resistentes.

La identificación de NG se hizo por medio de la fermentación de azúcares que se comparó con los agares ACT blando y ACT modificado.

Como NG es un aerobio estricto, el ACT modificado es un agar con superficie inclinada y ofrece una mayor área de utilización del sustrato. Aunque los resultados con ambos medios de cultivo fueron los mismos, el cambio de color por la fermentación en el agar modificado es más evidente.

Algunas veces la fermentación en el ACT no se presenta o es de difícil interpretación por lo siguiente:

1. No hay degradación del carbohidrato por bajo inóculo

bacteriano.

2. La degradación simultánea de glucosa y maltosa, se debe a la contaminación de los azúcares o a la presencia de un meningococo.
3. Todos los tubos son positivos, debido a incubación en CO₂ o contaminación. La aparición de un color intenso, amarillo brillante, sugiere contaminación; se debe hacer un examen con Gram⁶.

Es preocupante la alta prevalencia de 22.4% de NG en este grupo de población. Llama la atención que ninguna de las pacientes relató síntomas compatibles con la enfermedad, quizá por la automedicación que se mencionó antes. Tampoco hubo correlación entre la presencia de la bacteria y el estado del cuello uterino. Estos hallazgos refuerzan el hecho que en el control de la blenorragia, continúa siendo el cultivo el único instrumento diagnóstico que ofrece garantía para descubrir casos sintomáticos y asintomáticos y que otras técnicas diagnósticas, como la prueba enzimática, tienen limitaciones y no se pueden utilizar solas y menos en grupos de población con baja prevalencia de NG.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al Director y demás personal del Centro de Salud del Barrio Obrero; a la doctora María Beatriz Olaya, directora del Laboratorio de Salud Pública Departamental, personas que con su colaboración hicieron posible la realización de este trabajo.

SUMMARY

Neisseria gonorrhoeae prevalence was measured in a high risk group of 214 women who attend the Health Center at the Barrio Obrero in Cali, Colombia. The research work was performed by two different methods. The enzymatic test known as Gonozyme®, for antigen detection, showed a prevalence of 19.3% while the culture method, using Thayer-Martin agar, Thayer-Martin modified agar and chocolate agar plus VCN, gave 22.4% prevalence, with a total of 48 isolates. Of the isolated strains, 27.1% (13/48) were B-lactamase positive. Bacteria were identified by CTA agar.

REFERENCIAS

1. Anand, CM & Gubash, SM. Evaluation of the GO slide (Roche) growth transport system for isolation of *Neisseria gonorrhoeae* from clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 1986, 24: 96-98.
2. Schater, J, Pang, F, Parks, R, Smith RF & Armstrong, AS. Use

of Gonozyme on urine sediment for diagnosis of gonorrhea in males. *J Clin Microbiol*, 1986, 23: 124-125.

3. Skeels, MR, Matsuda, B, Horton, H, Sampson, J, Sawyer, GA & Mitchell, J. Evaluation of a modified enzyme immunoassay for *Neisseria gonorrhoeae* in high and low risk females. *Can J Microbiol*, 1985, 31: 893-985.
4. Thomas, E, Scott, SD, Grefkees, I *et al.* Validity and cost-effectiveness of the Gonozyme test in the diagnosis of gonorrhea. *Can Med Assoc J*, 1986, 15: 121-124, 146.
5. Horn, JE, Quinn, T, Hammer, M, Palmer, L & Falkow, S. Use of nucleic acid probes for the detection of sexually transmitted infections agents. *Diag Microbiol Infect Dis*, 1986, 4: 1015-1095.
6. Lennette, EH, Balows, A, Hausler, WJ Jr & Shadomy, HJ. *Manual of clinical microbiology*. 4th ed, American Society for Microbiology, Washington DC, 1985.
7. Schater, J, McCormack, WM, Smith, RF, Parks, R, Bailey, R & Ohlin, AC. Enzyme immunoassay for diagnosis of gonorrhea. *J Clin Microbiol*, 1984, 19: 57-59.
8. Nasello, MA, Callihan, DR, Menegus, MA & Steigbigel, RT. A solid-phase enzyme immunoassay (Gonozyme) test for direct detection of *Neisseria gonorrhoeae* antigen in urogenital specimens from patients at a sexually transmitted disease clinic. *Sex Trans Dis*, 1985, 12: 198-202.
9. Van Ulsen, J, Michell, MF, Van Strick, R, Van Eijk, RV, Van Joost, T & Stols, E. Experience with a modified solid-phase enzyme immunoassay for detection of gonorrhea in prostitutes. *Sex Trans Dis*, 1986, 13: 1-4.
10. Granato, DA & Roefaro, M. Comparative evaluation of enzyme immunoassay and culture for the laboratory diagnosis of gonorrhea. *Am J Clin Pathol*, 1985, 83: 613-618.
11. Bronken, TP, Dyke, JW & Andruszewski, MH. A solid-phase enzyme immunoassay in detection of cervical gonorrhea in a low-prevalence population. *J Fam Pract*, 1985, 20: 43-48.
12. Black, JR & Sparling, PF. *Neisseria gonorrhoeae*. Pp 1195-1205. In Mandell, G, Douglas, G & Bennet, J (eds). *Principles and practice of infectious diseases*. 1760 pp, 2nd ed, John Wiley & Sons, New York, 1984.
13. Arango, C, Bergonzoli, G, Zafra, G & Sarria, MN. Prevalencia de la *Neisseria gonorrhoeae* productora de beta-lactamasa. *Colombia Med*, 1986, 17: 70-74.