

## ACTUALIZACION

## Métodos rápidos para la identificación y confirmación de neisserias patógenas y especies relacionadas

F. L. Pantozzi, A. Pulido, J. L. Pérez

Servicio de Microbiología, Hospital de Bellvitge "Príncipes de España", Universidad de Barcelona, Feixa Llargá s/n. 08907 Hospitalet de Llobregat (Barcelona).

Algunas especies de neisserias como *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae* son agentes infecciosos de gran importancia clínica, lo que obliga a un diagnóstico microbiológico correcto. Recientemente se han descrito dos nuevas especies con características bioquímicas, morfológicas y de cultivo similares a las de aquéllas. Así, *Neisseria cinerea*, un comensal de las mucosas orofaríngea y, en menor medida, genitourinaria que se ha asociado esporádicamente en patología humana en un caso de proctitis<sup>1</sup> y otro de neumonía en un paciente con SIDA<sup>2</sup>. La importancia radica en los errores de identificación que se producen con *N. gonorrhoeae* hasta el punto de haberse planteado problemas médico legales.

Algo parecido ocurre con *Neisseria polysacchara*, especie de reciente descripción<sup>3</sup>, no incluida en la 9a. edición del Manual Bergey. Este microorganismo es un comensal de la orofaringe humana no asociado, por ahora, con patología. Es indistinguible de *N. meningitidis* por su patrón sacarolítico, características de cultivo, y porque comparte con el meningococo la localización faríngea, lo que ha ocasionado errores en la estimación del estado de portador<sup>3,4</sup>.

Con respecto a *Branhamella* spp., también se han producido modificaciones. En la 9a. edición del Bergey's desaparece como género válido y queda adscrita como subgénero de *Moraxella*<sup>5</sup>, quedando algunas especies incluidas como *species incertae sedis* dentro del género *Neisseria*. Debido a que en los últimos años ha sido considerado crecientemente el rol patógeno de *B. catarrhalis*

y, además, el hecho de compartir nicho ecológico (orofaringe, tracto genitourinario y recto) con las especies de neisserias, le confiere importancia a su identificación.

Los procedimientos clásicos para la identificación de neisserias se basan en: comprobar la presencia de diplococos Gram negativos, oxidasa y catalasa positivos, crecimiento en medios selectivos (Thayer Martin, Martin Lewis, New York City, etc.), y la producción de ácido de carbohidratos sobre medio de cisteinatriptosa (CTA)<sup>6</sup>. Este último, método de referencia, no siempre tiene resultados satisfactorios. Algunos de los problemas que se presentan son de tipo técnico: inóculo insuficiente, ausencia de cultivos puros, contaminación química de azúcares (por ej. maltosa con glucosa), condiciones inadecuadas de incubación y reversiones de pH en el medio<sup>6,8</sup>. Otras veces los problemas se presentan con cepas bioquímicamente poco activas o que poseen degradación atípica de azúcares; tal es el caso de *N. meningitidis* glucosa y/o maltosa negativas, *N. gonorrhoeae* que no utilizan glucosa, etc.<sup>9,11</sup>. Todo esto hace que muchas veces se retarde el tiempo de identificación superando las 48 horas.

La identificación de *B. catarrhalis* está basada en la presencia de diplococos Gram negativos, oxidasa positivos, patrón asacarolítico, producción de DNAsa y reducción de nitratos y nitritos<sup>6</sup>. Los resultados pueden obtenerse generalmente a las 24 horas del aislamiento primario, pero como comentaremos más adelante el tiempo puede reducirse considerablemente utilizando otras pruebas específicas y de más sencilla realización.

La necesidad de la correcta y precisa identificación de estos géneros y especies bacterianas es obvia. La rapidez es una virtud añadida que no hay que dejar de considerar, pero también el disponer de métodos sencillos y reproducibles que puedan ser aplicables a gran parte de los laboratorios de microbiología. He aquí el motivo de nuestra revisión.

Palabras claves:  
Métodos de diagnóstico rápido.  
*Neisseria*.

Dirección postal:  
Florencia Pantozzi, c/ Escipión 6, 2º C,  
08023 Barcelona, España

Manuscrito recibido el 13/8/90

## Nuevos métodos

Dentro de los nuevos métodos que se disponen citaremos: reacción superoxol, perfiles enzimáticos (glucosidasas, aminopeptidasas y estererasas), métodos inmunológicos y sondas de ADN.

### SUPEROXOL

La reacción superoxol es una prueba sencilla, rápida y sumamente económica. Se basa en demostrar la mayor actividad catalasa que poseen *N. gonorrhoeae* y *B. catarrhalis*. Cuando se utiliza agua oxigenada al 30% (superoxol), estas cepas producen una reacción brusca e inmediata (reacción positiva) a diferencia del resto de las neisserias que produce un burbujeo débil y/o retardado<sup>12</sup>. Posee excelente sensibilidad y valor predictivo negativo, pero es inespecífica en cuanto a neisserias, ya que algunas pocas cepas de meningococo y otras neisserias dan reacción positiva<sup>18,19</sup>.

### ENZIMAS PREFORMADOS

Los métodos basados en la utilización de enzimas preformados tienen aplicación sobre diferentes sustratos. Poseen la ventaja de no necesitar el crecimiento microbiano. Se realizan a partir de cultivos primarios, agilizando así los resultados de identificación entre 1 y 4 horas<sup>6,16,18</sup>. Son de fácil realización, interpretación y económicos.

#### a) Glucosidasas. Método rápido de degradación de azúcares

Es una variante del método convencional con las ventajas señaladas anteriormente. Es una alternativa aceptable, que evita algunas dificultades técnicas del método CTA pero no supera los problemas asociados a cepas atípicas.

#### b) Aminopeptidasas

En los últimos años se han comercializado en diferentes países algunos sistemas enzimáticos de identificación basados en la detección de diversas aminopeptidasas y que comentamos a continuación.

#### *Gamma-glutamil aminopeptidasa (GGT)*

La GGT está presente en todas las cepas de *N. meningitidis*<sup>17,18</sup>, y es la única especie que da positiva la prueba entre las que crecen en medios se-

lectivos. Además es la prueba más rápida para diferenciarla de *N. polysaccharea* negativa<sup>4</sup>, ya que para observar la producción de polisacárido de sacarosa y el requerimiento nutricional de cistina-cisteína de esta última, se necesita entre 18-24 horas. En algunas cepas de las especies saprófitas es posible detectar la GGT utilizando ciertas técnicas e incubaciones prolongadas, sin embargo en nuestra experiencia con incubaciones de 4 horas, se obtuvo una especificidad del 100%<sup>20</sup>.

Es muy útil como prueba auxiliar confirmatoria de *N. meningitidis*, en la identificación presuntiva (por ej. un aislamiento faríngeo en caso de meningitis con cultivo negativo) y en estudio de portadores.

#### *Profil aminopeptidasa (PRO)*

La PRO, si bien es considerada como marcador de *N. gonorrhoeae*<sup>20</sup>, carece de especificidad para utilizarla como prueba esencial, ya que prácticamente todas las neisserias saprófitas, incluyendo *Neisseria lactamica* y *N. polysaccharea* dan resultados positivos<sup>17,20</sup>. Si bien esta prueba debe hacerse a partir de medios selectivos Thayer Martin o similares, es posible identificar falsamente como gonococos las cepas de *N. lactamica* y *N. polysaccharea* que crecen también en ellos y otras especies saprófitas que lo hacen excepcionalmente.

#### c) Estererasas

El método de enzimas preformados puede utilizarse también para la detección de butiratoesterasa, prueba de suma importancia para diferenciar *B. catarrhalis* de *Neisseria* spp.<sup>21,23</sup>. La sensibilidad y especificidad de la prueba es prácticamente del 100%<sup>24,25</sup>. Se utilizan tributirato de glicerina (tributirina)<sup>26</sup> o 4 metil-umbeliferil-butirato<sup>27</sup> como sustratos.

La prueba de tributirina es cromógena, por viraje de un indicador de pH (rojo fenol) producida por la liberación de ácido butírico. Cuando se utiliza el 4-metil-umbeliferil-butirato, la lectura se realiza observando la fluorescencia producida bajo luz UV. Dependiendo de la técnica que se realice, se obtienen resultados positivos a los 30 seg, 5 min y 3 horas<sup>25,26</sup>.

Esta determinación no distingue *B. catarrhalis* de las otras especies de *Branhamella* (*B. caviae*, *B. cuniculi*, *B. ovis*), pero estas últimas no se aislan en humanos. Algunas especies afines como *Moraxella*, también dan positiva la prueba<sup>27</sup>, pero se diferencian fácilmente por su morfología.

## METODOS INMUNOLOGICOS

Los métodos inmunológicos que consideraremos para la detección de *N. gonorrhoeae* son los basados en anticuerpos monoclonales, ya que los que utilizan anticuerpos policlonales carecen de especificidad<sup>28, 29</sup>. Detectan componentes específicos de la membrana externa. Se utilizan en reacciones de coaglutinación, inmunofluorescencia y enzimoimmunoensayo.

### a) Coaglutinación

Dentro de este método citaremos resultados obtenidos por diferentes autores, a partir de dos kits comerciales. El Phadebact Monoclonal GC OMNI Test kit (Pharmacia, Uppsala, Suecia) y el GonoGen (GG; New Horizons Diagnostics, Columbia, Md.).

Según Dillon *et al*<sup>29</sup> y Anand *et al*<sup>30</sup> el reactivo Phadebact posee una especificidad ca. 91%. Para Carlson *et al*<sup>31</sup> es del 100%, mientras que Evins *et al* obtuvieron valores del 60%<sup>28</sup>. Entre las especies en que se observaron falsos positivos figuran *N. cinerea*, *N. lactamica*, *N. meningitidis*, otras neisserias y *B. catarrhalis*<sup>29</sup>. La sensibilidad hallada por estos autores fue similar, ca. 99%<sup>28, 31</sup>. El GonoGen posee mayor concordancia de datos según los diferentes autores. En algunos<sup>28, 30, 32</sup>, la especificidad fue del 100% y para Dillon *et al*<sup>29</sup> del 99,1%.

### b) Inmunofluorescencia Directa

El método de Ac. monoclonales fluorescentes se detecta por el equipo comercial, Syva Micro Track Neisseria gonorrhoeae Culture Confirmation Test (Syva Co., Estados Unidos), que posee anticuerpos de ratón marcados con fluoresceína contra las proteínas de membrana externa 1A y 1B de gonococo. De esta manera a partir del cultivo primario, podemos visualizar por medio de esta técnica reacciones específicas de antígeno-anticuerpo, aproximadamente en 15 minutos.

Los datos obtenidos por diferentes autores muestran concordancia: Ridderhof *et al*<sup>33</sup> y Welch *et al*<sup>34</sup> obtienen una especificidad del 100% y una sensibilidad alrededor del 94%. Otros autores han comunicado 100% de sensibilidad y especificidad. Creemos importante comentar la experiencia de Walton<sup>35</sup> sobre dos aislamientos de *N. gonorrhoeae* productoras de penicilasa que no pudieron ser identificadas por este método, por lo que recomienda la utilización de otro método confirmatorio.

### c) Enzimoimmunoensayo (ELISA)

El ELISA, para el diagnóstico de *N. gonorrhoeae* (Gonozyme Abbot Laboratories), es un método basado en la detección del antígeno presente en muestras uretrales y cervicales. Se utiliza el método del "doble sandwich" y el resultado es cuantificado por medio de un espectrofotómetro. Los resultados globales varían de acuerdo con la población sujeto de estudio. Schachter *et al*<sup>36</sup> obtienen una sensibilidad ca. 93% y una especificidad del 100% en muestras uretrales masculinas y una sensibilidad del 87% en muestras cervicales, siendo la especificidad ca. 97%. Resultados similares fueron obtenidos también por Aardom *et al*<sup>37</sup> y Danielsson *et al*<sup>38</sup>.

## SONDAS DE ADN

Por último consideraremos el diagnóstico de *N. gonorrhoeae* por sondas de ADN. Este método, teóricamente posee una exquisita sensibilidad y especificidad, ya que detecta secuencias únicas de mononucleótidos que lo distinguen de otras especies bacterianas.

Una sonda de ADN es un pequeño trozo de ácido nucleico sintético, monocatenario, que puede unirse al ADN o ARN complementario. Partiendo de colonias de un cultivo primario, se realiza la lisis bacteriana y los ácidos nucleicos liberados son inmovilizados sobre una membrana, donde posteriormente se aplicará la solución con las sondas de ADN. Si existe complementaridad a una región de las cadenas diana, se llevará a cabo la reasociación o hibridización. Esta hibridización es la que se detecta en la lectura<sup>39</sup>.

Existen varios métodos para realizarla. Uno de ellos es el marcado radioactivo de la sonda, descrito por Totten *et al*<sup>40</sup> en 1983 para la identificación de *N. gonorrhoeae*, con el inconveniente de poseer un tiempo muy corto de vida media de los reactivos y la necesidad de disponer de contadores gamma. La otra alternativa para el marcado de las sondas, es el uso de conjugados enzimáticos de biotina-avidina. El sistema OrthoProbe (Ortho Diagnostic Systems Inc.) utiliza esta última. El tiempo total de la prueba es de 10-15 minutos y se evitan los inconvenientes del método anterior.

La sensibilidad y especificidad obtenidas por Kuritza *et al*<sup>39</sup> utilizando este sistema fue del 100%. Para Ridderhof *et al*<sup>33</sup> y Robinson *et al*<sup>41</sup>, la especificidad fue sólo del 65 al 67%, por lo que en la práctica se observan diferencias a las esperadas teóricamente.

## Valoración crítica y aplicación

Las pruebas para la identificación bacteriana poseen diferente valor según el germen y muestra en cuestión, así como el caso clínico en particular. En el caso de *N. gonorrhoeae* aislada a partir de una uretritis del varón heterosexual, la prueba superoxol puede aplicarse por sí sola dada su sensibilidad y buen valor predictivo, ya que una reacción negativa excluye al gonococo, siempre considerando la coloración de Gram, pruebas de oxidasa y crecimiento en medios selectivos.

En el polo opuesto, en el caso de aislamientos procedentes de niños prepúberes y, en general, de aquellos diagnósticos que por las consecuencias sociales o legales que se derivan podríamos llamar de "alto riesgo", donde otras neisserias pueden confundir la identificación, son necesarios al menos dos métodos para realizar el diagnóstico. Aquí las pruebas de azúcares preformados pueden orientarnos. El superoxol es útil para el cribado de *N. gonorrhoeae* porque un resultado negativo excluye el gonococo. Es de suma importancia la utilización de otro método con diferente fundamento, como por ejemplo el empleo de métodos de anticuerpos monoclonales.

El aislamiento de una neisseria de LCR o material faríngeo que sólo utiliza la glucosa, no debe ser informada como *N. gonorrhoeae* sin proceder a otras pruebas, aunque puedan ser aisladas de estos materiales clínicos, ya que se han descrito casos, como señalamos anteriormente, de *N. meningitidis* maltosa negativas. Aquí la prueba de la GGT es de suma importancia, ya que es específica para esta última especie. También permite distinguir *N. polysaccharea* del meningococo. Si bien la protil aminopeptidasa es positiva y la GGT es negativa para gonococos, también lo son para la mayoría de las neisserias saprofitas (*N. sicca*, *N. lactamica*, *N. cinerea*, *N. flavescens*, *N. subflava*), por lo que las consideraremos de inferior valor que el superoxol, en la identificación de *N. gonorrhoeae*. Ya se ha citado anteriormente que los sustratos enzimáticos comerciales incluyen la detección de estos dos enzimas. Aunque los fabricantes insisten en la aplicación exclusiva sobre aislamientos que crecen en medios selectivos, la posibilidad de falsas identificaciones de gonococo debe tenerse presente con las neisserias saprofitas que crecen en dichos medios. Se aplicarán con cautela en aislamientos orofaríngeos, los procedentes de homosexuales, etc.

En cuanto a los métodos inmunológicos para la identificación de *N. gonorrhoeae*, la coagulación según diferentes autores y el equipo comercial empleado, no alcanza el 100% de la especificidad como para ser utilizada como prueba

única. Sí, podría utilizarse en el caso de ser necesario otro método confirmatorio. Además escapa a las posibilidades económicas de muchos laboratorios y sirve sólo para identificar gonococo.

La inmunofluorescencia, si bien posee una especificidad ca. 100%, el costo elevado del equipo, la necesidad de utilizar microscopía de fluorescencia y el antecedente de las dos cepas productoras de penicilinas no detectados por este método, son inconvenientes a tener en cuenta.

Por los datos obtenidos según los autores citados, se concluye que el método ELISA posee una sensibilidad, especificidad y valor predictivo similar a la coloración de Gram en la uretritis masculina sintomática. En teoría, podría jugar un rol en el cribado de gonorrea cervical en poblaciones de bajo riesgo (1% de prevalencia). En este sentido, el trabajo ya citado de Schachter *et al*<sup>28</sup> ilustra perfectamente las limitaciones de este método en particular y de todos los métodos indirectos en general (inmunológicos, sondas de ADN, etc.) que no implican el aislamiento en cultivo. Cuando estos autores hacían un análisis de proyección teórica, considerando sus mejores resultados de sensibilidad (86,8%) y especificidad (97,9%) en una población de bajo riesgo (1% de prevalencia) de 10.000 pacientes, obtenían el resultado sorprendente de que 205 de 292 pacientes eran falsamente diagnosticados de gonococia. En otras palabras, el valor predictivo positivo era tan sólo del 29,8% en esa población. Además la necesidad tanto clínica como epidemiológica de determinar la resistencia a penicilinas, ya sea por producción de betalactamasas como por impermeabilidad, hace imprescindible el cultivo de este microorganismo. De todo esto se concluye, que esta técnica carece de utilidad práctica.

Desde el punto de vista de los métodos indicados, y al hilo de la discusión, es preciso dejar dos ideas claras sobre el valor predictivo. Primera: los métodos indirectos nunca deberían aplicarse al cribado (*screening*) de poblaciones de bajo riesgo por pequeña que sea la inespecificidad. Por ejemplo, no son aplicables a la detección de gonococia asintomática en mujeres de consulta ginecológica habitual y de centros de planificación familiar. Segunda: tampoco se aplicarán al diagnóstico en poblaciones de alto riesgo cuando sean poco sensibles.

Las sondas de ADN, escapan en la actualidad de las posibilidades de muchos laboratorios, pero hay que tenerlas presentes y que a corto o mediano plazo estarán disponibles y pueden modificar radicalmente las estrategias del diagnóstico microbiológico.

Para la identificación de *B. catarrhalis*, con la utilización de la prueba de butirato esterasa,

## Apéndice: Reactivos y Métodos

### REACCION SUPEROXOL

**Reactivos:** Agua oxigenada al 30%.

**Método:** Se coloca una gota del reactivo sobre un portaobjetos y se emulsiona con 2-3 colonias del microorganismo en estudio. La reacción se considera positiva cuando inmediatamente, se produce un burbujeo manifiesto.

### ENZIMAS PREFORMADOS

#### A). Glucosidasas. Degradación rápida de azúcares

**Reactivos:**

- a) Solución salina tamponada más indicador  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> .....0,04 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .....0,01 g  
KCl 0,80 g  
Sol. 1% Rojo fenol .....0,40 ml  
Agua destilada .....100 ml  
Almacenar en botellas de vidrio estériles a 5° C.

- b) Solución de carbohidratos: Soluciones al 20% P/V de glucosa, lactosa, sacarosa y fructosa en agua destilada. Si se desea, esterilizar por filtración. Almacenar a 20° C en tubos de vidrio, en alícuotas de 5 o 10 ml.

**Método:**

Tomar 5 tubos por cada determinación y agregar 0,1 ml de la solución A) a cada uno y una gota (0,04 ml) de la solución B) de cada carbohidrato. Realizar una suspensión el microorganismo, colocando 2 ansadas del cultivo puro en 0,3 ml de la solución A) y colocar una gota en cada tubo de la batería de azúcares. Agitar manualmente e incubar en baño a 37° C.

La reacción positiva se manifiesta por el cambio de color de rojo a amarillo dado por la acidificación del medio. Se distingue entre los 15 y 30 min., aunque algunas cepas lo hacen entre las 3 y 4 horas.

No es aconsejable la incubación prolongada por la posible contaminación.

#### B). Aminopeptidasas

*Gamaglutamilaminopeptidasa (GGT)*

a) **MÉTODO N° 1.**

**Reactivos:**

- Tabletas comerciales de GGT (Rosco Diagnóstica, Dinamarca).

- Solución de Fast Blue BB en 2-metoxietanol al 0,35%.

**Método:**

Preparar una suspensión del microorganismo problema con una turbidez igual o superior al patrón N° 2 Mc Farland, en 0,5 ml de solución fisiológica. Añadir la tableta correspondiente e incubar a 37° C durante 4 horas. Agregar 3 gotas de la solución de Fast Blue BB y proceder a la lectura.

La reacción es considerada positiva cuando se obtiene un color rojo-naranja en el sobrenadante.

b) **MÉTODO N° 2**

**Reactivos:**

- GGT New Merck (R. Federal de Alemania), comercializado para la dosificación de este enzima en suero.

**Método:**

El sustrato enzimático liofilizado se disuelve en la solución tampón, facilitada por el propio preparado comercial, repartiéndose en tubos a razón de 1 ml. Efectuar una suspensión de la cepa en estudio (aprox. N° 2 Mc Farland), e incubar 18 horas a 37° C.

Las reacciones positivas dan lugar al desarrollo de un color amarillo intenso.

#### *Prolilaminopeptidasa (PRO)*

**Reactivos:**

- Tabletas comerciales de PRO (Rosco Diagnóstica, Dinamarca).  
- Solución de Fast Blue BB en 2-metoxietanol al 0,35%.

**Método:**

Proceder de igual forma que en la técnica de GGT.

#### C). Esterasas

##### *Butiratoesterasa*

1) **Método acidimétrico**

**Reactivos:**

- Tabletas comerciales de Tributirina (Rosco Diagnóstica, Dinamarca).

**Método:**

Realizar una suspensión del microorganismo a estudiar en 0,5 ml de solución fisiológica (aprox. N° 2 Mc Farland). Agregar la tableta, mezclar e incu-

bar a 35° C. Realizar las lecturas durante 4 horas con intervalos de 1 hora.  
La reacción positiva se demuestra por el desarrollo de un color amarillo brillante.

2) *Método fluorogénico en tubo*

Reactivos:

Solución Madre

- 4-metil-umbriferil-butirato .....100 mg
- Dimetil-sulfóxido .....10 ml
- Triton X-100 .....0,1 ml

Diluir 1/10 en 0,1M de buffer citrato (pH 5,0).  
Fraccionar 2,5 ml en tubos transparentes y almacenar a -70° C. La vida media es, por lo menos, de 30 días.

Método:

En el momento de la determinación, descongelar el tubo a utilizar y una vez que haya tomado la temperatura ambiente, suspender 2-3 colonias de un cultivo reciente (no mayor de 24 horas).

El resultado positivo se demuestra observando la fluorescencia, tras exponer el tubo bajo luz UV a 366 nm. Las lecturas se realizan a los 5 y 15 minutos.

3) *Método rápido en papel*

Reactivos:

- Idéntico al del método en tubo.

Método:

Colocar 1-2 gotas del reactivo sobre un trozo de papel de filtro. Tomar con el ansa 2-3 colonias de un cultivo reciente y aplicarlas sobre el papel. Inmediatamente exponer bajo la luz UV.

El resultado positivo se determina por la aparición de una fluorescencia azul intensa. Las lecturas se realizan a los 30 segundos, 1 y 3 minutos.

MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

A). *Coaglutinación*

*Phadebact® Monoclonal GC OMNI*

Reactivos:

- Phadebact monoclonal GC OMNI Test Kit (Farmacia, Uppsala, Suecia). Contiene pool de anticuerpos monoclonales de ratón contra las proteínas 1A y 1B de la membrana externa de *N. gonorrhoeae*, correspondientes a los serogrupos W1 y W2/3 respectivamente, unidos a células de *Staphylococcus aureus*.

Método:

Llevar a ebullición durante 5 min. una suspensión de microorganismos, preparada en 0,5 ml de solución fisiológica, a partir de un cultivo fresco. Colocar 1 gota de la suspensión sobre 1 gota de re-

activo OMNI y sobre 1 gota de reactivo control y mezclar.  
La aglutinación, reacción positiva, se produce dentro del primer minuto.

*GonoGen® Test*

Reactivos:

- GonoGen Test (New Horizons Diagnostics, Columbia). Anticuerpos monoclonales de ratón hacia la proteína 1 de *N. gonorrhoeae*, adsorbidos a estafilococos muertos por calor.

Método:

El procedimiento del método se realiza de idéntica manera que el descrito anteriormente.

B). *Inmunofluorescencia Directa*

Reactivos:

- Syva MicroTrak test (Syva Co., Palo Alto, California): Anticuerpos monoclonales de ratón marcados con fluoresceína contra las proteínas de membrana externa 1A y 1B de gonococo.

Método:

Según indicaciones del fabricante. La prueba se considera positiva al observar la presencia de diplococos con fluorescencia de color verde manzana.

C). *Enzimoimmunoensayo (ELISA)*

*Gonozyme® (Abbott Laboratories)*

Reactivos:

- Esferas de poliestireno tratadas y absorbidas con gonococos y antígenos de gonococo.
- Anticuerpos de conejo antigonococos.
- Anticuerpos de cabra anti IgG de conejo, conjugada con peroxidasa de rábano picante.
- O-fenilendiamida 2,50 ug/ml en buffer citrato-fosfato que contiene peróxido de hidrógeno al 0,02%.

Método:

Según indicaciones del fabricante. Tiempo aproximado de la técnica: 45 minutos.

SONDAS DE ADN

Orthoprobe *N. gonorrhoeae* (Ortho diagnostics)

Reactivos y Método:

Según las especificaciones del fabricante. Tiempo mínimo aproximado por prueba: 15 min.

morfología, reacción de oxidasa y superoxol, se está en condiciones de hacer un diagnóstico rápido de esta especie microbiana

De lo anteriormente expuesto, consideramos que con la utilización de escasas pruebas (superoxol, GGT, butiratoesterasa), partiendo de un cultivo inicial en agar chocolate, Thayer Martin o similar y agar nutritivo, el microbiólogo clínico está en condiciones de identificar neisserias patógenas y *B. catarrhalis*, de manera segura, rápida, económica y sencilla.

**Bibliografía**

1. Dossett JH, Appelbaum PC, Knapp JS, Totten PA. Proctitis associated with *Neisseria cinerea* misidentified as *Neisseria gonorrhoeae* in a child. *J. Clin. Microbiol.* 21: 575-577, 1985.
2. Boyce JM, Taylor MR, Mitchell EB, Knapp JS. Nosocomial pneumonia caused by glucose-metabolizing strain of *Neisseria cinerea*. *J. Clin. Microbiol.* 21: 1-3, 1985.
3. Riou JY, Guidaudenche M, Poppoff MY. A new taxon in the genus *Neisseria*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 134: 257-267, 1983.
4. Boquete MT, Marcos C, Saez-Nieto JA. Characterization of *Neisseria polysaccharae* sp. nov. (Riou, 1983) in previously identified noncapsular strains of *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Microbiol.* 23: 973-975, 1986.
5. Bove K. Neisseriaceae. En: Krieg NR (ed.). *Berge's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore 1984.
6. Morello JA, Janda WM, Bonhoff M. *Neisseria* and *Branhamella*. En: Lennette EH, Ballows A, Hausler WJ, Shadomy HJ (eds.). *Manual of clinical Microbiology* (4a. ed.). American society for Microbiology, Washington 1985.
7. Shtibel R, Toma S. *Neisseria gonorrhoeae*: evaluation of some methods used for carbohydrate utilization. *Can J. Microbiol.* 24: 177-181, 1978.
8. Arko RJ, Kinley-Price KG, Wong KH, Johnson SR, Reising G. Identification of problem *Neisseria gonorrhoeae* cultures by standard and experimental test. *J. Clin. Microbiol.* 1982; 15: 435-438.
9. Hoke C, Vedros NA. Characterization of atypical aerobic gram-negative cocci isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* 15: 906-914, 1982.
10. Sáez-Nieto JA, Fenoll A, Vázquez J, Casal J. Prevalence of maltose-negative *Neisseria meningitidis* variants during an epidemic period in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 15: 78-81, 1982.
11. Hodge DS, Ashton FE, Terro R, Ali AS. Organism resembling *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1546-1547, 1987.
12. Saginur R, Cleener B, Portnoy J, Mendelson J. Superoxol (catalase) test for identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.* 15: 475-477, 1982.
13. Pérez JL, García I, Savall R. Utilidad de la prueba superoxol en la identificación de *Neisseria gonorrhoeae*. *Enf. Infec. Microbiol. Clin.* 5: 110-112, 1987.
14. Young H, Harris AB, Tapnell JW. Differentiation of gonococcal and non-gonococcal neisseriae by the superoxol test. *Br. J. Vener. Dis.* 60: 87-89, 1984.
15. Yong DCT, Prytya A. Rapid micro-carbohydrate test for confirmation of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.* 8: 643-

- 647, 1978.
16. Brown WJ. Modification of the rapid fermentation test for *Neisseria gonorrhoeae*. *Appl. Microbiol.* 27: 1027-1030, 1974.
17. D'Amato RF, Enriquez LA, Tomfohrde KM, Singerman E. Rapid identification of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* by using enzymatic profiles. *K. J. Clin. Microbiol.* 7: 77-81, 1978.
18. Yajko DM, Chu A, Hadley WK. Rapid confirmatory identification of *Neisseria gonorrhoeae* with lectins and chromogenic substrates. *J. Clin. Microbiol.* 19: 380-382, 1984.
19. Coll P, Ballester F, López P, Prats G. Utilidad de la detección de gammaglutamil-transferasa para la diferenciación entre gonococo y meningococo. *Enf. Infec. Microbiol. Clin.* 5: 440-441, 1987.
20. Pérez JL, Gómez E, Berrocal CI, Sauca G. Superoxol test and aminopeptidase activity for the identification of *Neisseria gonorrhoeae*. Resúmenes 4th European Congress of clinical Microbiology, Niza, 1989.
21. Berger U. Ueber die spaltung von trybutyryn durch *Neisseria*. *Arch Hyg Bakteriol.* 146: 388-391, 1962.
22. Knapp JS. Historical perspectives and identification of *Neisseria* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.* 1: 415-431, 1988.
23. Vedros NA, Genus I. *Neisseria* revisan 1885. En: Krueg NR, Holt JG (eds.). *Bergeys manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams and Wilkins Co., Baltimore 1984.
24. Pérez JL, Sauca G, Pulido A, Murgui L, García D, Bosch J. Evaluación multicéntrica del sistema Rosco-Neisseria para la identificación de neisserias patógenas y *Branhamella catarrhalis*. *Enf. Infec. Microbiol. Clin.* en prensa.
25. Pérez JL, Pulido A, Pantozzi F, Martín R. Butyrate-esterase (tributyryn) test: a simple method for immediate identification of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. *J. Clin. Microbiol.* en prensa.
26. Riou JY, Buissiere J, Guibourdenche M, Brault G, Carlier JP. Hydrolyse de la tributyrine par les *Neisseria* et les *Branhamella*. *Ann Microbiol. (Inst. Pasteur)* 132A: 159-169, 1981.
27. Vanecchouatte M, Verschrægen G, Claeys G, Flamen P. Rapid identification of *Branhamella catarrhalis* with 4-methyl-umbelliferyl butyrate. *J. Clin. Microbiol.* 26: 1227-1228; 1988.
28. Ewins GM, Pigoy NE, Knapp JS, DeWitt WE. Panel of reference strains for evaluating serologic reagents used to identify gonococci. *J. Clin. Microbiol.* 26: 354-357, 1988.
29. Dillon JR, Carballo M, Bruze M. Evaluation of eight methods for identification for pathogenic *Neisseria* species: Neisseria-Kwik, RIM-N, Gonobio-Test, Minitck, Gonochek II, GonoGen, Phadepact Monoclonal GC OMNI Test, and Syva Micro-Trak test. *J. Clin. Microbiol.* 26: 493-497, 1988.
30. Annand CN, Gubash SM, Shaw H. Serologic confirmation of *Neisseria gonorrhoeae* by monoclonal antibody-based coagglutination procedures. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2283-2286, 1988.
31. Carlson BNL, Calnan MB, Goodman RE, George H. Phadepact Monoclonal GC OMNI test for confirmation of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1982-1984.
32. Lawton WB, Battaglioli, GJ. GonoGen coagglutination test for confirmation of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.* 18: 1264-1265, 1983.
33. Ridderhof JC, Vaughan M, Tinney A, Meier FA, Dalton HP. Two confirmatory tests for identification of *Neisseria gonorrhoeae* from primary culture. *J. Clin. Microbiol.* 28: 619-620, 1990.
34. Welch WD, Cartwright G. Fluorescent monoclonal antibody compared with carbohydrate utilization for rapid identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.* 26: 293-296,

1988.

35. Walton DT. Fluorescent-antibody-negative penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. J. Clin. Microbiol. 27: 1885-1886, 1989.
36. Schrachter J, Mc Cormack WM, Smith RF, Parks RM, Bailey R, Ohlin AC. Enzyme immunoassay for diagnosis of gonorrhoea. J. Clin. Microbiol. 19: 57-59, 1984.
37. Aardom HA, Hoop DD, Isserief COA, Michel MF, Stolz E. Detection of *Neisseria gonorrhoeae* antigen by a solid-phase enzyme immunoassay. Br. J. Vener Dis. 58: 359-362, 1982.
38. Danielson D, Moi H, Forstlin LK. Diagnosis of urogenital gonorrhoea by detecting gonococcal antigen with a solid phase enzyme immunoassay (Gonozyme™). J. Clin. Pathol. 36: 674-677, 1983.
39. Kuritzin AP, Edberg SC, Chapis C, Gallo P. Identification of *Neisseria gonorrhoeae* with the ORTHOProbe DNA probe test. Diag. Microbiol. Infect. Dis. 1989; 12: 129-132.
40. Totten PA, Holmes KK, Handsfield HH, Knapp JS, Perine PL, Falkow S. DNA hybridization technique for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in men with urethritis. J. Infect Dis. 148: 462-471, 1983.
41. Robinson BE, Downes FP, Pung D, Davis A, Kloss J. Resúmenes Annual Meeting fo the American Society for Microbiology 1989, C 353, p. 452.