

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Evaluación de diferentes métodos de utilización de azúcares en *Neisseria gonorrhoeae*

Dr. Rafael Llanes,<sup>1</sup> Téc. Idalmis Sánchez,<sup>2</sup> Téc. Joel Díaz,<sup>2</sup> Téc. Oderay Gutiérrez,<sup>2</sup> Lic. Daymi Guzmán,<sup>3</sup> Dr. Jorge Sosa<sup>4</sup> y Lic. Eduardo A Valdés<sup>5</sup>

### RESUMEN

Se evaluaron 5 métodos de utilización de azúcares en 25 cepas identificadas previamente como *Neisseria gonorrhoeae*: agar CTA, agar CTA modificado, agar gelatina almidón, agar Mueller Hinton más azul de bromotimol y método rápido. Por los métodos de CTA y rápido fueron identificadas 100 % de las cepas de *N. gonorrhoeae*, mientras que por los métodos de CTA modificado y agar gelatina almidón fue 96 %. Ninguna cepa de gonococo fue identificada por el método de agar Mueller Hinton más azul de bromotimol. El medio de agar cistina tripticasa (CTA), constituye el método de elección para confirmar los aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae*; es elaborado fundamentalmente por compañías norteamericanas, por lo que su adquisición en Cuba resulta difícil. Los métodos de agar gelatina almidón y rápido constituyen alternativas útiles del medio CTA, por lo que su uso se propone en este trabajo.

**DeCS:** CISTINA; AGAR; NEISSERIA GONORRHOEAE; CARBOHIDRATOS.

Para realizar la identificación definitiva de los aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* se utilizan pruebas de laboratorio con principios diferentes: enzimáticas, inmunológicas y de biología molecular. Las pruebas de utilización de azúcares que forman parte de las pruebas enzimáticas son las más empleadas para este propósito,<sup>1</sup> estas utilizan diversas bases de medios de cultivo.<sup>2,3</sup> El medio de agar cistina tripticasa (CTA), que promueve el desarrollo de muchos microorganismos exigentes, ha sido durante décadas el método tradicional para confirmar los aislamientos gonocócicos.<sup>4</sup> Este medio es elaborado fundamentalmente por compañías norteamericanas, por lo que su adquisición en Cuba resulta difícil, lo que ha sido constatado en recientes visitas de supervisión realizadas por el Laboratorio Nacional de

Referencia de Neisserias (LNRN) del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK) a la red de laboratorios de microbiología del país. Por otra parte, existe una variante rápida de las pruebas de utilización de azúcares en aislamientos gonocócicos, que representa una alternativa útil del método de CTA.<sup>5</sup> En la presente investigación sus autores se propusieron como objetivo evaluar métodos de cultivo alternativos para utilización de azúcares en cepas de *N. gonorrhoeae*.

### MÉTODOS

Fueron estudiadas 25 cepas, identificadas previamente como *N. gonorrhoeae*, pertenecientes al cepario del LNRN del IPK.

<sup>1</sup> Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Auxiliar.

<sup>2</sup> Técnico Medio en Procesos Biológicos.

<sup>3</sup> Licenciada en Microbiología. Aspirante a Investigadora.

<sup>4</sup> Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Auxiliar.

<sup>5</sup> Licenciado en Microbiología. Investigador Auxiliar.

Se utilizaron los medios de cultivo siguientes:

1. CTA (Difco).
2. CTA modificado.<sup>4</sup>
3. Agar gelatina almidón.
4. Agar Mueller Hinton más azul de bromotimol.<sup>2</sup>
5. Variante rápida de utilización de azúcares.<sup>3</sup>

A todos se les adicionaron los azúcares (glucosa, maltosa, lactosa y sacarosa), que fueron esterilizados por filtración con membranas de 0,22 mm y utilizados a la concentración de 1 % para los medios probados, excepto para la variante rápida, que fue a 20 % y el medio CTA modificado que se preparó a 2 %.

Las cepas, mantenidas en congelación (-70 °C) en medio de caldo tripticosa soya + glicerol 20 % fueron sembradas en medio de agar chocolate enriquecido con suplemento Vitox (Oxoid), a 2 % e incubadas durante 18 a 24 h a 35-36,5 °C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> 5 %. Al cabo de este tiempo, se observaron las características de las colonias y se realizó subcultivo a agar chocolate enriquecido, bajo las mismas condiciones.<sup>6</sup> Para cualesquiera de los métodos utilizados se trabajó siempre con cultivos puros y jóvenes (18 a 24 h de incubación) y con inóculo abundante (una asada).<sup>4</sup>

La siembra en los diferentes medios se realizó de la forma siguiente: el medio 1 se sembró por punción en la superficie (1 cm de profundidad); el medio 2, preparado en forma de cuña, fue inoculado a lo largo de toda la superficie; el medio 4 fue sembrado en forma de roseta en la superficie de la placa de agar, con una distancia entre cepas de 0,5 y 1 cm; y los medios 3 y 5 fueron inoculados en toda su extensión. Una vez realizada la siembra, los medios fueron incubados entre 35 y 36,5 °C, *sin* CO<sub>2</sub>, y durante 1 a 3 d, con lectura diaria, excepto para el método rápido que se incubó de 1 a 4 h.<sup>2-4</sup> Como cepas controles fueron empleadas las siguientes: *N. gonorrhoeae* WHO A (control positivo de glucosa), *Neisseria meningitidis* 385 (control positivo de maltosa) y *Neisseria lactamica* LNP 411 (control positivo de lactosa). Como controles negativos se emplearon los diferentes medios de cultivo, *sin* *inocular*. La lectura e interpretación de los resultados se realizó sobre la base de la literatura consultada.<sup>2-4</sup>

## RESULTADOS

Por los métodos de CTA y rápido, pudieron ser identificadas 100 % de las cepas como *N. gonorrhoeae*, mientras que por los métodos de CTA modificado y agar gelatina almidón lo fue 96 %. Ninguna cepa de gonococo pudo ser identificada por el método de agar Mueller Hinton + azul de bromotimol (tabla), sin embargo, los microorganismos controles *N. meningitidis* y *N. lactamica* sí utilizaron los azúcares que los identifican como especie, en este medio de cultivo.

**TABLA.** Resultados de la identificación de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* según métodos de utilización de azúcares (No. %)

CTA	CTA modificado	Agar gelatina almidón	Variante rápida	Mueller Hinton + azul bromotimol
25/100	24/96	24/96	25/100	0/0

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos con las 2 variantes del medio base CTA están en correspondencia con lo expresado por otros autores, que refieren que este representa el medio de referencia para identificar los aislamientos como *N. gonorrhoeae* y permite un mejor crecimiento del microorganismo.<sup>7</sup> En el caso del medio CTA modificado, este garantiza un mayor y más rápido crecimiento bacteriano; porque el microorganismo aprovecha mejor las condiciones de aerobiosis presentes en el medio, y existe gran similitud en los resultados obtenidos con esta variante y el método de CTA.<sup>4</sup>

La prueba rápida de las pruebas de utilización de azúcares, a diferencia de otros métodos, tiene la ventaja de permitir almacenar el medio sin inocular por un mayor período de tiempo, a la temperatura de -20 °C.<sup>8</sup> En la literatura se señala la alta reproducibilidad de los resultados obtenidos con este método, en relación con el CTA.<sup>3,5</sup>

El medio de agar almidón gelatina representa una alternativa confiable para la identificación definitiva de gonococos (JL Zuazo, comunicación personal, 1978), lo cual quedó probado en esta investigación.

El medio de agar Mueller Hinton + azul de bromotimol ha sido utilizado como una variante para evaluar la fermentación de azúcares en *N. meningitidis*,<sup>2</sup> no se ha descrito su uso en *N. gonorrhoeae*. Se conoce que esta última bacteria es, a diferencia del meningococo, un microorganismo "fastidioso", de ahí que requiera de medios suplementados con sangre o proteínas para crecer,<sup>4,8</sup> por lo que los autores de este trabajo suponen que la ausencia de crecimiento de las cepas de gonococo en este medio de cultivo se debe a esta causa.

De acuerdo con los resultados del presente estudio, los métodos de agar almidón gelatina y la variante rápida, fueron útiles para evaluar la capacidad de empleo de azúcares en cepas de *N. gonorrhoeae*, por lo que se propone su uso en el medio cubano como una alternativa del medio CTA.

#### SUMMARY

5 methods of utilization of sugars were evaluated in 25 strains previously identified as *N. gonorrhoeae*: CTA agar, modified CTA agar, gelatin starch agar, Mueller Hinton agar plus bromotimol blue and rapid method. 100 % of the strains of *N. gonorrhoeae* were identified by the CTA and rapid methods, whereas 96 % were identified by the modified CTA and gelatin starch agar methods. No strain of gonococcus was identified by the Mueller Hinton agar method plus bromotimol blue. The cystine tripticase agar medium (CTA) is the elective method to confirm the isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. As it is mainly made by U.S. companies, it is difficult for Cuba to acquire it. The gelatin-starch agar method and the rapid method are useful alternative of the CTA medium, so their use is proposed in this paper.

**Subject headings:** CYSTINE; AGAR; NEISSERIA GONORRHOEAE; CARBOHYDRATES.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kellogg JA, Orwig LK. Comparison of Gonogen, Gonogen II, and Microtrak Direct Fluorescent Antibody Test with Carbohydrate Fermentation for Confirmation of Culture Isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. J Clin Microbiol 1995;33(2):474-6.
2. Sotolongo F. *Neisseria meningitidis*: Aspectos Teórico-prácticos sobre el diagnóstico, clasificación y valoración de la respuesta inmune. 3ed. Ciudad de La Habana: Ediciones Finlay, 1995:p.39-42.
3. Sonnawirth AC. Cocos Gram Positivos y Gram Negativos. En: Sonnawirth AC & Jarett L (eds) Métodos y Diagnóstico del Laboratorio Clínico de Gradwohl. T3. La Habana: Editorial Científico Técnica; 1983, p.1526-8.
4. Knapp JS, Koumans EH. *Neisseria* & *Branhamella*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA (eds) Manual of Clinical Microbiology 7 ed. , Washington DC: ASM Press; 1999, p. 568-603.
5. Kellogg DS Jr, Turner EM. Rapid fermentation confirmation of *Neisseria gonorrhoeae*. Applied Microbiol 1973;25:550-2.
6. Llanes R, Sosa J, Guzmán D. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Cuba (1995-1999). Implications for Treatment of Gonorrhoea. J Sex Transm Dis 2003;30(1):10-4.
7. Turner A, Gough KR, Jephcott AE. Comparison of three methods for culture confirmation of *Neisseria gonorrhoeae* currently circulating in the UK. J Clin Pathol 1995;48:919-23.
8. Koneman EW. Diagnóstico microbiológico. Textos y Atlas Color. 3ed. Mexico DF: Edit Médica Panamericana; 1998: p. 394-411.

Recibido: 7 de junio de 2001. Aprobado: 20 de diciembre de 2002.

Dr. Rafael Llanes Caballero. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" Apartado Postal 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: ciipk@ipk.sld.cu