

**RECOMENDACIONES PARA EL CULTIVO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE
Neisseria gonorrhoeae EN EL LABORATORIO CLÍNICO.**

AUTOR ISP

T.M. Rodrigo Colina Morales

Encargado del Laboratorio de Agentes de Infecciones de Transmisión Sexual ITS
Sección Bacteriología. Subdepto. De Enfermedades Infecciosas. Departamento
Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile.

COAUTORA ISP

T.M. Alejandra Manríquez Cortez

Profesional del Laboratorio de Agentes de Infecciones de Transmisión Sexual ITS
Sección Bacteriología. Subdepto. De Enfermedades Infecciosas. Departamento
Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile.

REVISORES INTERNOS

BQ. Pamela Araya Rodríguez

Jefe Sección Bacteriología. Subdepto. de Enfermedades Infecciosas. Departamento
Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile.

Dr. Juan Carlos Hormazábal Opazo

Jefe de Subdepartamento de Enfermedades Infecciosas. Departamento Laboratorio
Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile.

Dra. Verónica Ramírez Muñoz

Jefe Subdepto. Coordinación Externa. Departamento Laboratorio Biomédico. Instituto
de Salud Pública de Chile.

REVISORES EXTERNOS

Dr. Leonardo Chanqueo Cornejo

Jefe Departamento Programa Nacional de Prevención y Control de VIH/SIDA e ITS.
División de Prevención y Control de Enfermedades. Subsecretaría de Salud Pública.
Ministerio de Salud.

33 ALCANCE

34 Las recomendaciones para el cultivo, aislamiento e identificación de *Neisseria*
35 *gonorrhoeae*, están orientadas a los laboratorios clínicos del país y complementan lo
36 especificado en el Reglamento sobre Notificación de Enfermedades Transmisibles de
37 Declaración Obligatoria y su Vigilancia D.S. N°7/2019 para la realización de la vigilancia
38 de laboratorio de este agente bacteriano.

39

40 1. INTRODUCCION

41 La Gonorrea es producida por la bacteria *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*), un
42 diplococo Gram negativo, no flagelado, que carece de cápsula y cuya superficie externa
43 está compuesta por fimbrias que consisten en largos pelos de proteínas compuestos de
44 subunidades de péptidos (pilis). ¹

45 *N. gonorrhoeae* infecta diferentes tipos de mucosas, de preferencia las urogenitales,
46 uretra masculina, cérvix femenino y recto, la oro y nasofaringe, entre otras, causando
47 infecciones sintomáticas y asintomáticas. Su principal forma de transmisión es por
48 contacto sexual. *N. gonorrhoeae* es siempre patógena para el ser humano.³

49 En general, esta infección produce sintomatología fundamentalmente en hombres
50 (uretritis o descarga uretral), lo que permite la consulta y tratamiento oportuno, en
51 cambio, en las mujeres las manifestaciones son generalmente asintomáticas, hasta que
52 se producen complicaciones como la enfermedad inflamatoria pélvica, la que puede
53 llegar a producir infertilidad o embarazo ectópico. *N. gonorrhoeae* también puede
54 producir infección en los lactantes causada por la exposición al exudado cervical, en el
55 momento del parto. La probabilidad de coinfección con otras infecciones de transmisión
56 sexual (ITS) puede ser alta en algunos grupos de pacientes. La transmisión es por
57 contacto sexual, no por fómites.

58 La resistencia de las cepas de *N. gonorrhoeae* es el desafío más grande por superar en
59 el control de la gonorrea. Las cepas de *N. gonorrhoeae* han presentado resistencia a las
60 penicilinas, tetraciclinas, espectinomicina, fluoroquinolonas (ciprofloxacina y ofloxacina),
61 al macrólido azitromicina y cefalosporinas de tercera generación. La ceftriaxona es
62 actualmente el antimicrobiano de elección para el tratamiento de la infección causada
63 por *N. gonorrhoeae*. La resistencia a las penicilinas y tetraciclinas es conferida por
64 mecanismos cromosómicos o mediados por plásmidos. La resistencia a la
65 espectinomicina, fluoroquinolonas y azitromicina está mediada por cromosomas. Ciertos
66 tipos de mutaciones cromosómicas pueden contribuir a la resistencia simultánea a
67 varias clases de antibióticos³.

68 Debido a la emergencia de cepas resistentes a las cefalosporinas de tercera generación,
69 la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha generado un plan de acción cuyo objetivo
70 es controlar la propagación y minimizar el impacto de esta resistencia a través de la
71 generación de políticas de salud pública para prevenir, controlar, proporcionar
72 estrategias y proveer recomendaciones para la coordinación, colaboración y actividades
73 de promoción a nivel nacional, regional e internacional.

El Laboratorio de Agentes de Infecciones de Transmisión Sexual del Instituto de Salud Pública (ISP) es el Laboratorio Nacional y de Referencia para estudio de *Neisseria gonorrhoeae*, realizando la confirmación y la vigilancia de la susceptibilidad antimicrobiana a los aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* enviados por los laboratorios clínicos públicos y privados del país. Al mismo tiempo, Chile es parte de la red RELAVRA, cuyo objetivo es reforzar las redes de salud pública que investigan la emergencia de resistencia antimicrobiana de aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* en América latina y el Caribe.

2. TOMA DE MUESTRA

Los especímenes clínicos para el aislamiento de *N. gonorrhoeae* pueden ser obtenidos de muestras del tracto genital, uretra, recto y orofaringe, inclusive de la conjuntiva de los neonatos infectados durante el nacimiento o de las personas adultas infectadas por exposición.

El momento ideal para la recolección de especímenes es antes de comenzar con el tratamiento de antibióticos.

Se debe usar idealmente hisopos o tómulas de dacrón o rayón. No se deben usar tómulas de alginato de calcio, ya que pueden ser tóxicos para el *N. gonorrhoeae* y las tómulas de algodón contienen ácidos grasos no saturados que pueden inhibir el desarrollo de *N. gonorrhoeae*.

MUESTRAS GENITALES

Secreción uretral

Lo ideal es que la persona no haya orinado durante 2 horas por lo menos, ya que al orinar se reduce la cantidad de exudado lo que puede disminuir la posibilidad de detectar microorganismos.

Hombre: Usar torulas delgadas. Si hay exudado, recoger con la torula estéril. En ausencia de exudado, solicitar al paciente la estimulación de la secreción, presionando la uretra. Si se humedece la torula con suero fisiológico antes de insertarlo, puede ayudar a reducir la molestia. Luego introducir 3-4 cms la torula, rotando lentamente.

Mujer: Limpiar la zona del meato urinario con gasa estéril o torula. Estimular la secreción mediante masaje de la uretra contra la sínfisis del pubis a través de la vagina

Si existen las condiciones adecuadas, la torula puede ser usada directamente para inocular el medio de cultivo apropiado o puede ser colocada en medio de transporte.

113 **Secreción Vaginal**

114 Tomar la muestra de la zona donde el exudado sea más abundante. En ausencia de
115 exudado, tomar la muestra del fondo del saco vaginal posterior con uso de espéculo.
116 Las muestras de secreción vaginal no son consideradas óptimas para el diagnóstico de
117 gonorrea, salvo en el estudio diagnóstico de prepúberes.

118 **Secreción Endocervical**

119 Insertar un espéculo no lubricado para visualizar el cérvix. Limpiar el cuello uterino de
120 secreciones vaginales y moco. Luego insertar una torula estéril 2-3 cm dentro del canal
121 endocervical y rotar 180° por 5 a 10 segundos. No se deben de tomar especímenes
122 cervicales en prepúberes, pues las infecciones de transmisión sexual (ITS) en este grupo
123 etario involucran la vagina y no el cérvix. Para prepúberes, se prefieren y son aceptables
124 los especímenes de lavado vaginal. Si esto no es posible, deslice una torula estéril
125 contra la pared posterior de la vagina y permita que absorba al espécimen. (En niñas
126 muy pequeñas utilizar torulas muy finas, como las usadas en las muestras uretrales de
127 hombres).

128 **MUESTRAS NO GENITALES**

129 **Secreción anal/rectal**

130 Insertar la torulas 2-3 cm en el canal anal. Presionar lateralmente para evitar la materia
131 fecal y rotar la torula. Si se observa contaminación fecal visible, desechar la torula y
132 tomar una nueva muestra.

133 **Secreción faríngea**

134 Utilizar depresor lingual para una correcta visualización. Usar una torula estéril para
135 tomar una muestra de la faringe posterior, amígdalas y áreas inflamadas. Evitar
136 contaminar con microbiota de mucosas y lengua.

137 **Secreción conjuntival**

138 Todo tipo de exudado o pus presente en el ojo debe ser retirado con cuidado, usando
139 una torula estéril. Posteriormente, con una segunda torula humedecida con suero
140 fisiológico, realizar la toma del área afectada de la conjuntiva.

141 **Sangre y líquidos estériles**

142 En caso de procesos infecciosos sistémicos además de realizar el cultivo corriente,
143 siempre agregar el estudio con viales de hemocultivos.

144 **Orina**

145 No es la muestra recomendada para realizar un cultivo corriente. Su solicitud está mas
146 orientada para realizar las pruebas moleculares.

147

3. TRANSPORTE DE LA MUESTRA

El sistema de transporte está condicionado por la distancia que puede existir entre el lugar de toma de muestra y el Laboratorio. **El transporte de los especímenes es siempre uno de los componentes más críticos para la recuperación exitosa de aislamientos de *N. gonorrhoeae*, dada su labilidad.**

Puede haber dos sistemas de transporte:

- Sistemas no nutritivos como el medio de transporte Amies con carbón sólido o líquido, capaz de mantener la viabilidad del microorganismo, hasta por 12 horas a temperatura ambiente (siempre que no haya temperaturas extremas).
- Sistemas nutritivos o de crecimiento en que la muestra se siembra directamente en una placa de Agar con nutrientes y se incuba inmediatamente en CO₂ a 36 °C ± 1°C en medio ambiente húmedo.

Es fundamental la siembra en el medio de cultivo lo antes posible al ser recibido en el laboratorio clínico.

4. CULTIVO

El cultivo es importante para el diagnóstico de personas sintomáticas, útil en muestras genitales y no genitales tales como faríngeas, anorectales, conjuntivales y de líquidos estériles. El aislamiento bacteriano es fundamental para la vigilancia de la susceptibilidad a los antibióticos, debido a que las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos solo permiten la identificación del microorganismo. Por lo mismo, para cumplir con la vigilancia se debe realizar el cultivo en los pacientes con signos y síntomas compatibles con gonorrea. Esto permitirá realizar el estudio de susceptibilidad antimicrobiana y generar las alertas necesarias para el manejo de la persona y sus contactos.

Se recomienda utilizar **medios selectivos** para el cultivo primario de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* en pacientes. Estos medios contienen antibióticos como Vancomicina y Colistin, para inhibir las bacterias Gram positivas y Gram negativas respectivamente; Nistatina o Anfotericina, para inhibir el crecimiento de hongos y lactato de trimetropin, para inhibir las especies de *Proteus*.

Estos medios poseen Agar base GC con 1% de suplemento vitamínico y 10% de hemoglobina. Los medios selectivos comunes incluyen al medio Thayer Martin Modificado, medio Martin Lewis y medio Nueva York.

Existen medios no-selectivos utilizados generalmente para subcultivar y enriquecer los cultivos primarios. El principal es el medio Agar Chocolate con suplemento vitamínico, el cual puede utilizarse al mismo tiempo que un medio selectivo como cultivo primario. Esto es recomendable, ya que existe un pequeño porcentaje de *N. gonorrhoeae* sensibles a la Vancomicina usada en el medio selectivo, por lo que no son recuperados.

El medio de cultivo Agar Chocolate NO está recomendado para realizar el antibiograma.

5. CONDICIONES DE INCUBACIÓN

N. gonorrhoeae requiere medios y condiciones complejas para su desarrollo y crece mejor a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en un medio ambiente húmedo, enriquecido con una atmósfera con 5% de CO_2 . Incubar en estas condiciones por 20-24 horas.

Los procedimientos para proveer una atmósfera con 5% de CO_2 , puede ser a través de una estufa incubadora con CO_2 o por el sistema de Jembec con tabletas generadoras de CO_2 . Sin embargo, la atmósfera puede ser obtenida colocando una vela no perfumada en un tarro de extinción con tapa; se enciende la vela, se colocan los cultivos dentro del tarro y se cierra herméticamente la tapa. La vela debe ser encendida nuevamente cada vez que se abre el tarro.

Las cepas de *N. gonorrhoeae* también necesitan de ambientes húmedos para crecer, esto se puede conseguir utilizando estufas con humidificadores automáticos o bandejas con agua incorporadas agregando bandejas con agua en el piso de la estufa o colocando toallas de papel húmedas en el fondo de las jarras de extinción.

Las placas se deben observar diariamente hasta por 72 horas antes de descartarlas como negativas.

6. CONSERVACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS

N. gonorrhoeae es una bacteria muy lábil y las cepas aisladas no pueden sobrevivir en medios de cultivo con nutrientes por más de 36-48 horas, si no son subcultivados. Lo ideal es subcultivar los aislamientos cada 20-24 horas. El medio ideal para enriquecimiento y subcultivo es el Agar Chocolate.

7. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS

Las pruebas de identificación son necesarias para realizar un diagnóstico diferencial, debido a la posibilidad de aislar cepas de otras especies distintas a *Neisseria* en una muestra de origen urogenital y un diagnóstico certero en aislamientos en muestras de origen no urogenital.

Las pruebas de identificación presuntiva son un método de orientación en los casos en que se requiera un diagnóstico diferencial y no se cuente con metodologías de identificación confirmatoria. Entre las pruebas de identificación presuntivas están la tinción de Gram, las características y morfología de las colonias, la prueba de la oxidasa y la prueba de la catalasa al 30%.

Dentro de las pruebas confirmatorias se pueden incluir las metodologías de fermentación de azúcares (Agar CTA) o galerías de fermentación-enzimáticas (API NH), así como otras metodologías automatizadas (VITEK), la espectrometría de masas (Maldi-tof) y pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (PCR), entre otros.

7.1 IDENTIFICACIÓN DE *NEISSERIA GONORRHOEAE* DESDE UNA MUESTRA CLÍNICA:

TINCIÓN DE GRAM

La tinción de gram continúa siendo uno de los mejores métodos de orientación para el diagnóstico presuntivo de infección por *N. gonorrhoeae* en áreas genitales.

En hombres, la presencia de diplococos Gram negativos extra e intracelulares en los leucocitos polimorfonucleares (PMN_s) abundantes, puede ser considerado indicativo de infección por *N. gonorrhoeae* en un 97-98% de los casos sintomáticos. Si bien la tinción de Gram es altamente sugerente, es imprescindible obtener una colonia para realizar las pruebas confirmatorias, y el estudio de susceptibilidad.

Para obtener resultados óptimos, la preparación de las láminas debe ser realizada inmediatamente después de la toma de muestra. Rotar la torula suavemente sobre la superficie de la lámina solo en una dirección este método minimiza la distorsión y rotura de los PMN_s y apariencia de los microorganismos.

Las tinciones preparadas desde muestras que vienen en medio transporte podrían ser difíciles de interpretar debido a la distorsión de los PMN_s por sustancias interferentes como el carbón.

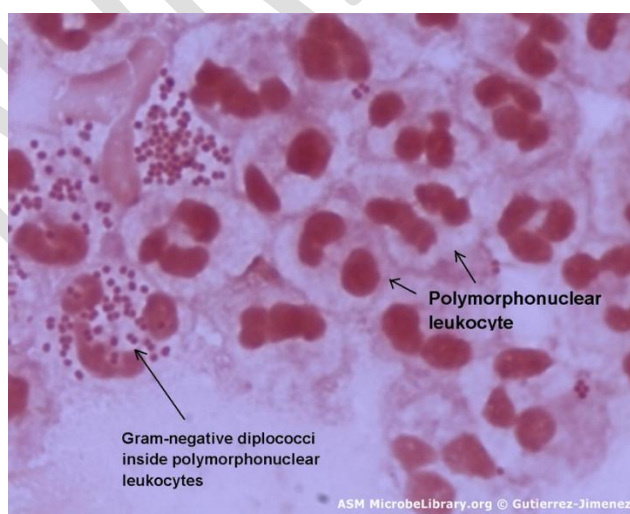


Figura N° 1: Tinción de Gram con diplococos Gram negativos. ¹

251 PRUEBA DE AMPLIFICACIÓN MOLECULAR

252 Son pruebas moleculares que detectan la presencia de material genético (ADN o ARN)
253 de un microorganismo. Son actualmente las pruebas más sensibles y específicas para
254 detectar muchos agentes infecciosos, especialmente en infecciones de transmisión
255 sexual (ITS).

256 Presentan una alta sensibilidad, ya que detectan incluso muy bajas cantidades de
257 patógeno y una alta especificidad, ya que detectan secuencias genéticas únicas del
258 microorganismo. Es una metodología rápida ya que sus resultados están en pocas
259 horas.

260 Se emplean diferentes métodos para la detección específica de los ácidos nucleicos
261 bacterianos, tales como

- 262 • PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (RT-PCR *reverse transcription PCR*) Es la
263 más usada. Amplifica ADN/ARN usando ciclos térmicos. Muy precisa.
- 264 • TMA (*Transcription- Mediated Amplification*) Isotérmica. Ideal para pruebas de
265 alto rendimiento (bacterias y virus causantes de ITS).
- 266 • LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*) También Isotérmica. Rápida y no
267 necesita equipos tan complejos.
- 268 • NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*) Especializada en ARN.
269 Similar a TMA.

270 El tipo de muestras recomendadas es la orina de primer chorro en hombres y muestras
271 vaginales en mujeres. Aunque también pueden aplicarse a muestras obtenidas por
272 procedimientos invasivos como son las muestras de uretra o endocérvix.

273 **Su desventaja radica en que no se puede realizar el estudio de susceptibilidad**
274 **antimicrobiana. Debido a esto, es necesario realizar siempre el cultivo de *N.***
275 ***gonorrhoeae* y así obtener cepas viables para estudiar la resistencia a los**
276 **antibióticos**

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286 **Tabla 1. Estudio microbiológico de *N. gonorrhoeae* según muestra y prueba a**
 287 **solicitar**

Tipo de muestra	Tinción de Gram ¹	Cultivo	Prueba de amplificación de ácidos nucleicos
Hisopado endocervical	Sí	Sí	Sí
Secreción vaginal	No ¹	Sí ²	Sí
Orina (1 ^{er} chorro)	No ¹	No	Sí
Secreción uretral	Sí	Sí	Sí
Hisopado rectal	No ¹	Sí	Sí ³
Hisopado orofaríngeo	No ¹	Sí	Sí ³
Hisopado conjuntival	Sí	Sí	No ³
Líquido articular, sangre u otras muestras extragenitales	Sí ⁴	Sí	No ³

1: No se recomienda la tinción de Gram en muestras vaginales, urinarias, rectales ni orofaríngeas.
 2: El cultivo de secreción vaginal (hisopado) sólo se recomienda en prepúberes y personas histerectomizadas.
 3: La aplicación de pruebas de amplificación de ácidos nucleicos en muestras extragenitales —rectales, orofaríngeas u oculares— requiere la aprobación y validación técnica previa del fabricante para su uso, en consideración a que varios de estos ensayos no cuentan con autorización para dichos sitios anatómicos.
 4.- Estudio de tinción de Gram en el contexto de estudio microbiológico habitual.

288 Fuente: Adaptado de: Unemo M, Cole M, Lewis D, Ndowa F, Van Der Pol B, Wi T, editors. Laboratory and point-of-
 289 care diagnostic testing for sexually transmitted infections, including HIV. Geneva: World Health Organization; 2023.
 290 Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

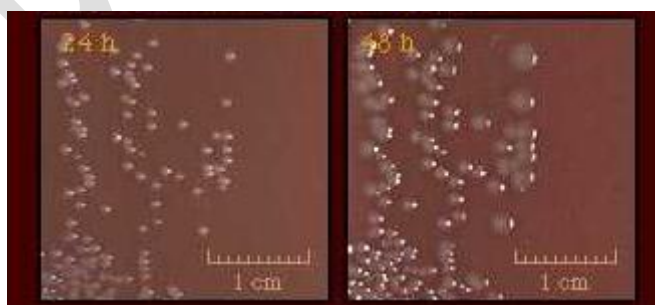
291

292 **7.2 IDENTIFICACIÓN DE *Neisseria gonorrhoeae* DESDE EL AISLAMIENTO DE** 293 **UNA COLONIA**

294 **MORFOLOGÍA DE COLONIAS**

295 Las colonias típicas de *N. gonorrhoeae* presentan un color grisáceo y son traslúcidas,
 296 de 0,5 -1,0 mm de diámetro, de consistencia lisa y márgenes definidos. Las colonias
 297 tienden a ser convexas en elevación.

298



299

300 **Figura N° 2:** Morfología de colonias de *Neisseria gonorrhoeae* a las 24 y 48 horas en medio de
 301 cultivo Thayer Martin.¹²

302

303 PRUEBA DE LA OXIDASA

304 La prueba de oxidasa utiliza reactivo de Kovac (una solución al 1% p/vol. de *N,N, N', N'*
 305 –tetrametil-*p*-dihidroclofenilendiamina) para detectar la presencia de citocromo *c* en la
 306 cadena respiratoria de un microorganismo bacteriano; si el reactivo de oxidasa es
 307 catalizado, se torna color púrpura. Las especies de *Neisseria* dan reacción positiva a la
 308 oxidasa. Como el reactivo de oxidasa es tóxico para la bacteria, se recomienda realizar
 309 la prueba de oxidasa en un hisopo estéril y no directamente en la placa de cultivo,
 310 especialmente si solo existen unas pocas colonias sospechosas. Puede usarse papel
 311 de filtro en vez de hisopo para esta prueba. **No use asa de Nicromo para la prueba de**
 312 **oxidasa**, pues puede producirse una reacción positiva falsa.

313

314 Método del papel filtro:

- 315 • Coloque una pieza de papel filtro en una placa Petri.
- 316 • Justo antes de hacer la prueba, añada una o dos gotas de reactivo de Kovac al
 317 papel filtro, y deje que el papel lo absorba; el papel filtro deberá estar húmedo,
 318 pero no mojado.
- 319 • Tome un parte de la colonia seleccionada para la prueba usando un asa de
 320 platino, un asa plástica, un hisopo estéril o un aplicador de madera y frótela en
 321 el papel de filtro humedecido. Si el aislamiento es *N.gonorrhoeae*, debe ocurrir
 322 una reacción positiva púrpura dentro de 10 segundos.

323



324

Figura N° 3: Reacción Test de Oxidasa.

Fotografía del autor

325

326

327

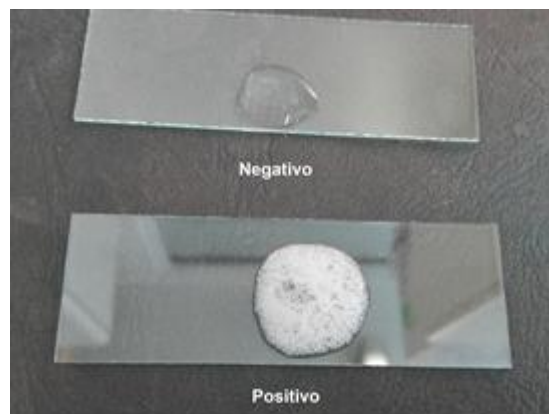
328 PRUEBA DE SUPEROXOL (CATALASA)

329 Esta prueba utiliza **peróxido de hidrógeno al 30%** como reactivo. Las reacciones con
 330 cepas de *N. gonorrhoeae* son típicamente “explosivas”, muy fuertes (4+) , a diferencia
 331 de la mayoría de las especies de *Neisseria* no gonocócicas, y las reacciones negativas
 332 de *Kingella denitrificans*.

333 *N. meningitidis* y *N. lactamica*, las otras especies que crecen en medio selectivo,
 334 también producen esta reacción pero más débil y lenta.

- 335 • Coloque una o dos gota de reactivo en un portaobjeto o en una placa petri.
- 336 • Inocule las colonias sospechosas usando un hisopo, asa plástica o aplicador de
- 337 madera en el reactivo.
- 338 • Las cepas de *N. gonorrhoeae* tienen una reacción típica muy fuerte (4+),
- 339 “explosiva” al contacto con el reactivo superoxol.
- 340 Si el borboteo se retrasa 3 segundos o más, o si éste es débil o no hay borboteo,
- 341 se considera negativa para *N. gonorrhoeae*.

342



343

344 **Figura N°4:** Test de Catalasa al 30%. Reacción positiva de colonias de *Neisseria gonorrhoeae*.
345 Fotografía del autor.

346

347 **PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS DESDE CARBOHIDRATOS EN MEDIO CTA**

348 Es una metodología que no se utiliza rutinariamente, pero es el fundamento de la
349 mayoría de las identificaciones cromogénicas.

350 Es una prueba bioquímica para identificación de *Neisseria*, en que se determina la
351 producción de ácido de los carbohidratos en Agar Cistina-Tripticasa (CTA), es un medio
352 semisólido que contiene azúcares al 1%, esterilizados por filtración.

353 La batería de azúcares incluye: glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa, fructosa y un tubo
354 control (sin azúcar)

355 Protocolo:

- 356 • Preparar una suspensión de la cepa bacteriana fresca en 5 ml de suero
- 357 fisiológico estéril. Ésta debe tener una densidad correspondiente a 3 unidades
- 358 Mc Farland aproximadamente.
- 359 • Tomar la suspensión con pipeta y depositar unas gotas de la suspensión en el
- 360 medio CTA.
- 361 • Repetir el punto anterior con cada tubo hasta completar la batería de azúcares.
- 362 • Incubar en estufa de cultivo a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 20 a 24 horas.

363

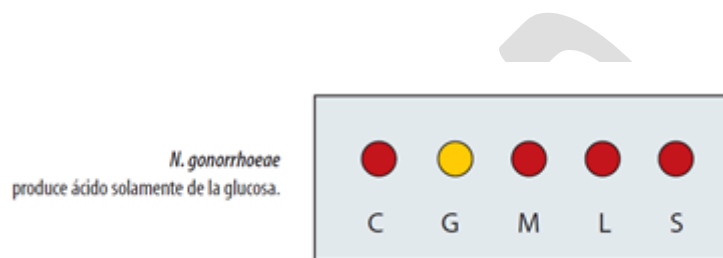
364 Interpretación de Resultados:

365 Resultado positivo: se observa que un viraje de color rojo a amarillo del medio, esto
366 debido a que el Agar CTA, contiene un indicador de pH rojo fenol. Significa que la
367 bacteria fue capaz de producir ácido mediante la oxidación del azúcar.

368 Resultado Negativo: no hay viraje de color, porque no hay producción de ácido.

369 *Neisseria gonorrhoeae* produce el cambio a amarillo solamente en el tubo de la batería
370 que contiene glucosa.

371



372

373 **Figura N° 5:** Acidificación de carbohidratos ²

374

375

376 PRUEBAS DE ENZIMA-SUBSTRATO

377 La prueba cromogénica de enzima-sustrato detecta la producción de enzimas β -
378 galactosidasa, y glutamilaminopeptidasa e hidroxiprolilaminopeptidasa. Se la considera
379 “cromogénica” debido a los cambios de color que indican la presencia o ausencia de
380 ciertas enzimas en diferentes especies de *Neisseria*. La galería de pruebas está
381 disponible comercialmente y debe realizarse de acuerdo con las instrucciones del
382 fabricante. La mayoría de las pruebas enzima-sustrato se desarrollaron para
383 diferenciar entre aquellos microorganismos que se sabe que crecen en medios
384 selectivos para *Neisseria spp.*, por lo tanto, la documentación que acompaña a la
385 galería, por lo regular se limita a distinguir entre *N. gonorrhoeae* (que solo produce
386 hidroxiprolilaminopeptidasa), *N. meningitidis* (que produce γ -glutamylaminopeptidasa),
387 *N. lactamica* (que produce β -galactosidasa) y *Moraxella catarrhalis* (que no produce
388 ninguna de estas tres enzimas).

389 Por ejemplo, la galería **API® NH** es una prueba que permite la detección de enzimas, la
390 capacidad de acidificación de azúcares y que, además, permite la identificación
391 diferencial del género *Haemophilus*. Existen otras pruebas comerciales de similares
392 características, que utilizan la fermentación de azúcares y además incorporan
393 reacciones enzimáticas, para otorgar una mejor identificación.

394 Este tipo de ensayos son un sistema estandarizado de identificación bacteriana,
395 consistente en una serie de ensayos miniaturizados complementados con una base de

datos. La galería incluye 10 microtubos que contienen substratos deshidratados, para realizar 12 pruebas de identificación (reacciones enzimáticas o fermentaciones de azúcares). Las reacciones se producen tras un período de incubación y se traducen en cambios de coloración espontáneos o provocados por la adición de reactivos.

La técnica consiste en preparar una suspensión a una concentración 4.0 McFarland, en una ampolla con NaCl 0.85%. Esta suspensión se distribuye en las galerías de pruebas bioquímicas (50 µL aprox.) y posteriormente la galería se incuba por 2 horas a 36°C ± 1°C en condiciones aeróbicas. Después de la incubación se leen los resultados de las pruebas interpretándolas según el inserto del kit, obteniendo un perfil numérico, el cual corresponde a una identificación bacteriana detallada en el mismo inserto.

METODOLOGÍAS AUTOMATIZADAS

ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF

Es una técnica de determinación estructural que permite estudiar la distribución de las moléculas de una sustancia en función de su masa. MALDI, es un método suave de ionización que permite analizar moléculas grandes (como proteínas) sin fragmentarlas. TOF, se refiere al analizador de masas que mide el tiempo que tardan los iones en llegar a un detector. Este tiempo está relacionado con su relación masa/carga (m/z).

La principal ventaja de esta técnica respecto a otro tipo de espectrometría de masas es el análisis de macromoléculas con una fragmentación mínima. Esta característica la convierte en una técnica muy versátil en el laboratorio de Microbiología. Es actualmente la metodología de identificación mas utilizada para la identificación de microorganismos bacterianos.

EQUIPOS CON PANELES DE IDENTIFICACIÓN

Son sistemas automatizados ampliamente utilizados en microbiología clínica para la identificación de microorganismos (bacterias y hongos) y algunos para la determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos (antibiogramas). Se utiliza un aislamiento puro del *N. gonorrhoeae* en un medio enriquecido.

Debido a sus características bioquímicas de “fastidioso”, la identificación automatizada del *N. gonorrhoeae*, no es siempre concluyente. Puede confundirse con otras especies de *Neisseria*, como *N. meningitidis* o *N. lactamica*. Se recomienda confirmación adicional, que puede ser a través de pruebas presuntivas u otras confirmatorias anteriormente mencionadas.

No se recomienda el estudio de susceptibilidad de *Neisseria gonorrhoeae* por este método, ya que no está estandarizado.

Un ejemplo de estos sistemas es el Vitek. Se prepara una suspensión bacteriana estandarizada y se usa una tarjeta ID-NH (*Neisseria-Haemophilus*).

8. ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

El estudio de susceptibilidad antimicrobiana para *Neisseria gonorrhoeae* debe realizarse bajo condiciones muy controladas. La complejidad de la preparación de los medios de cultivo utilizados, la necesidad de uso de cepas de referencia y el estricto control de calidad de este procedimiento, generan que por recomendaciones de la OMS, los centros de referencia de cada país, sean los encargados de su realización.

En Chile, por ordenanza del Reglamento sobre Notificación de Enfermedades Transmisibles de Declaración Obligatoria y su Vigilancia D.S. N°7/2019, el Laboratorio de Referencia del Instituto de Salud Pública es el encargado de realizar este estudio, a las cepas de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas e identificadas por los laboratorios clínicos públicos y privados del país.

Esta vigilancia consiste en realizar el estudio de de susceptibilidad antimicrobiana para monitorear patrones nacionales de resistencia.

Este estudio se realiza determinando la concentración mínima inhibitoria (CIM) de las cepas de *Neisseria gonorrhoeae*.

Los antibióticos estudiados son los recomendados por la OMS: penicilina, tetraciclina, ciprofloxacina, ceftriaxona, azitromicina, espectinomicina y cefexima.

Esta organización también recomienda que el estudio de susceptibilidad sea realizado por los laboratorio de referencia técnica, por lo que los laboratorios clínicos no están supeditados a realizarlo. Los laboratorios pueden incorporar en su rutina, el uso de la prueba de detección de betalactamasa.

DETECCIÓN DE β LACTAMASA

Neisseria gonorrhoeae puede transportar plasmidios que producen la enzima penicilinas, también llamada β etalactamasa, que inactiva algunas penicilinas. La investigación por la presencia de β etalactamasa proporciona una información rápida en relación a la resistencia de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* a la penicilina, ampicilina y amoxicilina. Todos los aislamientos que producen β etalactamasa son clínicamente resistentes a esos agentes.

El método de la cefalosporina cromogénica es el método más simple para detectar la β etalactamasa en *N. gonorrhoeae*. La cefalosporina cromogénica o nitrocefina, tiene un espectro amplio de actividad y no se conoce que reaccione con otras enzimas bacterianas. Cuando la amida unida en el anillo β etalactámico de la cefalosporina cromogénica, nitrocefina, es hidrolizado por la acción de una β etalactamasa, ocurre un cambio de coloración.

Se pueden utilizar discos de cefinasa o discos impregnados con nitrocefina.

Cuando una bacteria produce esta enzima en cantidades significativas, el disco de color amarillo se vuelve rojo en el área en que se extiende la cepa.

472 Realización de la prueba:

- 473 • Utilizando una pinza, tomar el disco y pasarlo por la colonia sospechosa.
- 474 • Una reacción positiva aparecerá como un cambio de color amarillo a rojo en el área en
475 la que se aplicó el cultivo. El cambio de coloración no suele desarrollarse en todo el
476 disco. Un resultado negativo consiste en que no hay cambio de color en el disco.

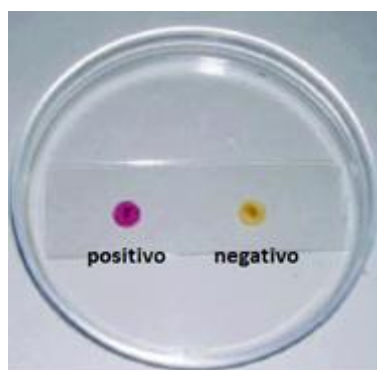


Figura N° 6: Prueba de la β lactamasa.
Fotografía del autor

477

478

479

480

481 9. CONSERVACIÓN DE CEPAS

482 En el caso de necesitar almacenar la cepa, se sugiere inocular el cultivo puro en un
483 criotubo con caldo tripticasa de soya con glicerol al 20% y mantener en un congelador
484 a una temperatura de -70°C . Bajo estas condiciones, las cepas de *N. gonorrhoeae*
485 pueden permanecer viables de manera indefinida.

486 La cepas conservadas a -20°C pueden sobrevivir por semanas o incluso meses, pero
487 no es lo ideal para conservación a largo plazo.

488

489 10. CONTROL DE CALIDAD

490 Los controles de calidad de las pruebas realizadas, deben realizarse con cepas de
491 referencia. Se recomienda el uso de la cepa *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226.

492

493 11. ENVÍO DE CEPAS AL ISP

494 El tipo de muestra necesaria para realizar la vigilancia de laboratorio, es una cepa
495 bacteriana confirmada de *Neisseria gonorrhoeae*.

496 La cepa a enviar debe ser fresca y obtenida de un subcultivo de 18 a 24 horas, tomada
497 de colonias aisladas y sin contaminación con microbiota comensal.

498 Para enviar la cepa, idealmente utilizar un medio de transporte Amies con carbón
499 activado u otro medio de transporte que asegure, por indicaciones del fabricante, la

500 viabilidad de bacterias exigentes. En caso contrario, se puede utilizar una placa de
501 medio de cultivo de agar Thayer Martin o agar Chocolate. En ambos casos de debe
502 tener las mismas consideraciones y enviar una cepa fresca, obtenida de colonias
503 aisladas y sin contaminación. No se debe enviar la placa de cultivo de la muestra
504 original.

505 Si la identificación es realizada por pruebas de amplificación molecular en la muestra
506 clínica de un paciente, no es aplicable la vigilancia de susceptibilidad del laboratorio,
507 dado que no se dispone de la colonia para el estudio, entonces no corresponde el envío
508 de antecedentes o información al ISP en relación al hallazgo.

509 El medio de transporte o la placa de cultivo deben rotularse con el nombre del paciente
510 y/o el número interno del laboratorio de origen y debe venir acompañada del Formulario
511 B1 "Formulario de envío de cepas" disponible en la web de ISP, el cual debe ser
512 debidamente completado con la información solicitada.

513 Las condiciones específicas del envío y los criterios de rechazo, están categorizadas en
514 la ficha técnica que se encuentra en el sitio web, en el catálogo de prestaciones. La
515 prestación específica es *NEISSERIA GONORRHOEAE VIGILANCIA*.

516 El sobre que contiene el formulario y la caja que contiene la muestra deben venir
517 rotulados de la siguiente manera cumpliendo con las condiciones de triple emblaje:¹³

Destinatario	Instituto de Salud Pública de Chile Sección Bacteriología Atención: Jefe Sección Bacteriología Av. Marathon N° 1000, Ñuñoa, Santiago Fonos: 22 575 5433 – 22 575 5201	 UN 3373
Remitente	Nombre del profesional que envía la cepa. Nombre del Hospital o Clínica Dirección Ciudad Teléfono	
		Conservar de 2 a 8 °C

518

519

520

521

522

523

524

525

526

12. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. *Epidemiología global de las enfermedades de transmisión sexual. The Lancet* 1998. Gerbase A., Rowley J., Mertens T.
2. *Manual para el laboratorio. Identificación de Neisseria gonorrhoeae y análisis de sus susceptibilidad a los antibióticos. 2ª edición. Centro coordinador para el GASP-LAC. 2011*
3. *Agentes patógenos bacterianos de transmisión sexual cuya resistencia a los antimicrobianos es causa de preocupación creciente. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades-CDC. Organización Mundial de la Salud-OMS. 2009*
4. *Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. Organización Mundial de la Salud. 2004*
5. *Procedimiento de Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. SEIMC. 24ª. 2018*
6. *Norma de Manejo y Tratamiento de .Infecciones de Transmisión Sexual (ITS). Ministerio de Salud de Chile. 2008*
7. *Norma de Profilaxis, Diagnóstico y Tratamiento de las Infecciones de Transmisión Sexual (ITS). Ministerio de Salud de Chile. 2016.*
8. *CLSI M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 35th edition. 2025*
9. *Documento de Consenso.Diagnóstico y Tratamiento de las Infecciones de Transmisión Sexual en Adultos, Niños y Adolescentes.Gobierno de España. Ministerio de Sanidad. 2024.*
10. *Microbiología Clínica. Murray P. Roshental K. Pfauer M. 2006.*
11. *American Society for Microbiology. microbelibrary.org*
12. *CDC. Centers for Disease Control and Prevention. www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/ngon.htm Infecciones gonocócicas en adultos, adolescentes, niños y neonatos. Jiménez Salgado, Ramírez Muñoz. Guía técnica para el transporte de sustancias infecciosas hacia el Instituto de Salud Pública. Guía Técnica. Santiago-Chile: Instituto de Salud Publica, Biomédico; 2021.*
13. *Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4th edition.2016.*
14. *Laboratory and point-of-care diagnostic testing for sexually transmitted infections, including HIV. World Health Organization.2023.*

Laboratorio de Agentes de Infecciones de Transmisión Sexual. Sección Bacteriología. Subdepartamento de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Salud Pública de Chile.