

ARTICULO

Comparación de la tinción fluorescencia modificada y Gram, en muestras urogenitales y perianales de pacientes asistidos en el área de Infecciones de Transmisión Sexual del Ambulatorio Arquímedes Fuentes, Cumaná estado Sucre

Evelin M. Flores F, Luzmila S. Albarado Y, Diannolys E. Thomas B, Aníbal Lobo

Laboratorio de Histología y Laboratorio de Microbiología, Departamento de Bioanálisis, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. Cumaná, Venezuela

Correspondencia: Evelin M. Flores
Calle Bolívar, Antigua Escuela de Enfermería, Piso 1, Departamento de Bioanálisis, UDO, Núcleo de Sucre. Cumaná, estado Sucre.(6101)
E-mail: evflores@cantv.net
Tel/Fax: +58-293 - 43174 13

Recibido: Junio 2007 **Aprobado:** Febrero 2008

RESUMEN

El uso clínico de coloraciones diferenciales para detectar infecciones de transmisión sexual sirve de guía en las decisiones terapéuticas tempranas. Fazii *et al.* (2002) diseñaron la técnica de coloración diferencial de fluorescencia que emplea naranja de acridina, decoloración con alcohol-acetona y fluoresceína de sodio, permitiendo hacer la distinción por fluorescencia entre bacterias grampositivas (aparecen amarillo) y gramnegativas (coloreadas verde), en base a esto se planteó evaluar el método de coloración diferencial de fluorescencia modificado con relación al Gram en bacterias de muestras, uretrales, endocervicales y perianales. Se estudiaron 49 muestras de pacientes asistidos en el área de Infecciones de Transmisión Sexual del Ambulatorio "Dr. Arquímedes Fuentes Serrano", Cumaná, estado Sucre. La técnica de fluorescencia según Fazii *et al.* (2002), se modificó ajustando la solución de fluoresceína a un pH de 6,5. La coloración de fluorescencia modificada identificó mayor número de muestras con bacterias que la coloración de Gram. Por otra parte, en los frotis de muestras uretrales y perianales, se observó por fluorescencia que todas las bacterias con morfología de diplococos emitieron una fluorescencia anaranjada; sólo en un frotis endocervical se visualizaron diplococos anaranjados fluorescentes, en el resto se observaron verdes con baja fluorescencia, explicándose este hecho sobre la base de la síntesis de ARN durante el ciclo celular bacteriano. La coloración de fluorescencia, probablemente, permita distinguir por microscopia óptica la expresión genética de los diplococos, referida, principalmente, al proceso de transcripción de ARN durante su ciclo celular. De modo que, considerando este hallazgo, así como la importancia que tiene el diagnóstico de la gonorrea, esto representa una contribución significativa para proseguir con estudios que evalúen por microscopia las características tintoriales con las coloraciones de Gram y fluorescencia, acompañadas por técnicas de cultivos, moleculares y microscopia electrónica, a fin de aportar más datos referentes a la ultraestructura, fisiología y mecanismos de patogenicidad de los gonococos y otras bacterias.

Palabras clave: diplococo gramnegativo, coloración de Gram, coloración diferencial de fluorescencia, naranja de acridina, fluoresceína de sodio.

ABSTRACT

The use of modified fluorescence and Gram stains in urogenital and perianal specimens in patients attending the Sexually Transmitted Disease Department of the "Arquimedes Fuentes" Primary Care Clinic. Cumaná, Sucre State. Venezuela

The clinical use of differential stains for detecting sexually transmitted infections is most useful as a guide for early therapeutic decisions. Fazii *et al.* (2002) designed the differential fluorescent staining method with acridine orange, decolorated with alcohol-acetone and sodium fluorescein, to establish the distinction by fluorescence between grampositive (yellow-looking) and gramnegative (green-looking) bacteria. Based on this, the purpose of this study was to evaluate the modified differential fluorescent staining method against the Gram in the identification of bacteria in urethral, endocervical and perianal specimens of 49 patients from the Department of Sexually Transmitted Diseases at "Dr. Arquimedes Fuentes Serrano" primary care clinic in Cumana, Sucre State, Venezuela. The fluorescent staining method, according to Fazii *et al.* (2002), was modified adjusting the fluorescein solution to pH 6.5. The modified fluorescent staining method identified a greater number of specimens with bacteria than the Gram method. On the other hand, in the urethral and perianal smears dyed with the modified differential fluorescent staining method, all the bacteria with a diplococcus morphology emitted an orange fluorescence; only in one endocervical smear an orange fluorescence diplococcus was observed; in the rest, a green color with low fluorescence was seen. This can be explained on the basis ARN synthesis during the bacterial cellular cycle. The modified differential fluorescent staining method, probably allows distinguishing by optical microscopy the genetic expression of diplococcus, mainly in terms of the process of ARN transcription during its cellular cycle. Therefore, considering this finding, as well as its importance for diagnosing gonorrhoea, it represents a significant contribution to continue studies that will evaluate by microscopy the staining characteristics with the Gram and fluorescence methods, along with cultures, molecular techniques and electron microscopy, with the propose of providing more data regarding ultrastructure, physiology and pathogen mechanisms of gonococcus and other bacteria.

Key words: gramnegative diplococcus, Gram staining, differential fluorescent staining method, acridine orange, sodium fluorescein.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) son las que se adquieren por contacto sexual. Las bacterias recuperadas del tracto genital, usualmente consideradas agentes causales de ITS son *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Chlamydia trachomatis*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Haemophilus ducreyi* (1).

En el diagnóstico de infecciones bacterianas, los microbiólogos son alentados a practicar el examen microscópico directo de las muestras enviadas para cultivo. La coloración diferencial de Gram es una de las técnicas más usadas e importantes en estudios microbiológicos y es empleada para demostrar las propiedades de tinción de todo tipo de bacterias, distinguiéndolas en grampositivas y gramnegativas (2,3).

El uso clínico de la coloración de Gram en las ITS, es para detectar inflamación uretral sugestiva de infección en el hombre y como guía para tomar decisiones tempranas en cuanto a la terapéutica (4). Usualmente, el estudio microscópico de muestras urogenitales es importante en la detección rápida y tratamiento de la gonorrea (5). En hombres, el uso de la coloración de Gram en extendidos de descarga uretral tiene una sensibilidad mayor al 90%, sin embargo, en mujeres la sensibilidad está alrededor del 40% al 50% (6).

Actualmente, la tinción con el fluorocromo naranja de acridina está siendo utilizada con más frecuencia en los laboratorios de microbiología, con el fin

de detectar bacterias en extendidos preparados a partir de líquidos y exudados; no obstante, tiene el inconveniente de que no permite diferenciar entre bacterias grampositivas y gramnegativas (2).

Fazii *et al.* (7) diseñaron una técnica de coloración diferencial de fluorescencia que permite hacer la detección y distinción de bacterias grampositivas y gramnegativas por fluorescencia, utilizando dos fluorocromos: el naranja de acridina, que actúa en la longitud de onda roja, y la fluoresceína, la cual actúa en la longitud de onda verde y juntos forman un sistema rojo/verde, las bacterias grampositivas se tiñen de amarillo fluorescente y las gramnegativas de verde fluorescente. Los investigadores demostraron que la coloración fue más sensible en la detección de bacterias, en subcultivos de hemocultivos, que al emplear la tinción de Gram. Asimismo, lo aplicaron en extendidos de secreciones uretrales de pacientes con cultivos positivos para *N. gonorrhoeae*, los gonococos fueron identificados en todos los frotis y la sensibilidad fue altamente significativa. Más tarde, Ciancaglini *et al.* (8), aplicaron el método de coloración diferencial de fluorescencia para detectar bacteriuria y obtuvieron sensibilidad, especificidad y valores predictivos superiores en comparación con la técnica de coloración de Gram.

La coloración de Gram presenta el inconveniente de que no detecta bacterias cuando se encuentran en número reducido o cuando ellas se adhieren a las células en muestras con demasiado material celular, como es el caso de las secreciones urogenitales (2). La coloración diferencial de fluorescencia ha sido aplicada en pocos estudios, por tal razón, el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar el método de coloración diferencial de fluorescencia modificado, con relación al Gram en bacterias grampositivas y gramnegativas de secreciones uretrales, endocervicales y perianales.

METODOS

Muestra poblacional. Se seleccionaron aleatoriamente un total de 49 pacientes de ambos sexos, 11 del sexo femenino y 38 del sexo masculino, que acudieron a la consulta del área de Infecciones de Transmisión Sexual (ITS-SIDA) del Ambulatorio "Dr. Arquímedes Fuentes Serrano" de Cumaná, estado Sucre, durante el período comprendido entre febrero y agosto del año 2005.

Muestra. La muestra estuvo representada por secreciones uretrales, endocervicales y perianales, estas últimas procedieron de los hombres homosexuales. Como criterio de exclusión aquellas que provenían de pacientes bajo tratamiento con antibióticos o haberlo recibido 72 horas previas a la toma de muestra. Las muestras fueron tomadas por el médico especialista, jefe del área de ITS-SIDA, cumpliendo las normas de ética establecidas por la Organización Mundial de la Salud, para trabajos de investigación en humanos y la declaración de Helsinki (9). Por cada paciente, se realizó un hisopado, destinado únicamente a la elaboración de frotis. Se realizaron dos frotis para la coloración de Gram y dos para la coloración diferencial de fluorescencia, los frotis se dejaron secar al aire y se fijaron por calor. El diagnóstico de enfermedad presuntiva por gonorrea, así como la identificación de otras bacterias fue basado en las características morfológicas y tintoriales de éstas en los frotis coloreados por Gram y fluorescencia.

Controles empleados. Como control para bacterias grampositivas se empleó *Staphylococcus aureus* ATTC 29213 y para gramnegativos se usó *Escherichia coli* ATTC 35218. Con estas cepas de referencia se realizaron extendidos a partir de caldos de cultivos de 24 horas y se tiñeron con las técnicas de coloración de Gram y fluorescencia (7).

Coloración de Gram. El procedimiento de coloración de Gram fue realizado según la técnica de Hucker modificada, del año 1927 (2).

Coloración diferencial de fluorescencia. La solución de naranja de acridina se preparó al 0,7%, en buffer acetato (pH 4,0). Para preparar un volumen de 100 mL de solución de naranja de acridina, se agregó 700 mg de naranja de acridina doble sal hemi (cloruro de zinc) (Sigma-Aldrich, A 6014) en 100 mL de buffer acetato pH 4,0. El buffer acetato pH 4,0, se preparó mezclando 82 mL de ácido acético (0,2 mol/l) con 18 mL de acetato de sodio (0,2 mol/l). El decolorante alcohol-acetona se preparó como una solución 50%-50%. La solución de fluoresceína de sodio se preparó al 0,002% en alcohol etílico (pH 5,5). Un volumen de 100 mL de solución contenía 2 mg de fluoresceína de sodio (Sigma-Aldrich, F 6377), 1,5 mL de ácido acético glacial, 0,5 mL de buffer acetato (pH 4,6) y 98 mL de alcohol etílico. El buffer acetato contenía 52 mL de ácido acético (0,2 mol/l) y 48 mL de acetato de sodio (0,2 mol/l) (7).

Modificación de la solución colorante de fluoresceína. La modificación de la solución de fluoresceína se realizó debido a que las bacterias controles, al ser coloreadas con la técnica descrita, no mostraron morfología definida, las bacterias grampositivas no emitían fluorescencia amarilla y la intensidad de fluorescencia de las bacterias gramnegativas era baja. Esta modificación consistió en diluir la fluoresceína en una solución de alcohol etílico (pH 6,5). Finalmente, la solución de 100 mL de fluoresceína contenía 2 mg de fluoresceína de sodio, 1,5 mL de ácido acético (0,4 mol/L), 0,5 mL de buffer acetato de pH 4,6 y 98 mL de alcohol etílico.

Procedimiento de coloración. Se cubrió la lámina con la solución de naranja de acridina por dos minutos, luego, se lavó con agua de chorro y se procedió a decolorar con alcohol-acetona exactamente por diez segundos, inclinando la lámina en un ángulo aproximado de 45°, se enjuagó nuevamente; se aplicó la solución de fluoresceína de sodio por dos minutos y se eliminó el colorante con agua. Se dejó secar para su observación (7).

Identificación microscópica. Coloración de Gram: cada una de las láminas coloreadas con esta técnica se observó con el microscopio óptico, con objetivo de 100X, visualizando e identificando las bacterias presentes en los frotis de acuerdo a sus características morfológicas y tintoriales. Las fotografías fueron tomadas con una cámara Kodak, usando un rollo Kodak Gold 35 mm de 100 ASAS, en modo auto, spot 1.0 y tiempo de exposición de 1.0 segundo.

Método de coloración diferencial de fluorescencia: Las láminas coloreadas se observaron con un microscopio de epifluorescencia marca Olympus BX 60, utilizando el filtro azul estándar (U-MWB2) del microscopio. Las láminas se observaron con objetivo de 100X. Las fotografías fueron tomadas con una cámara Kodak, usando un rollo marca Kodak Gold de 35 mm de 100 ASAS, en modo superfluorescencia, spot 1.0 y tiempo de exposición de 15 a 55 segundos.

Análisis estadístico. Se aplicó la prueba de chi-cuadrado para determinar si existen diferencias significativas entre los porcentajes de las bacterias identificadas en función de las características morfológicas y tintoriales de los dos métodos de coloración.

RESULTADOS

Los pacientes estudiados tuvieron una edad promedio de $29,47 \pm 11,29$ años; recolectándose para el análisis microscópico 24 (48,98%) muestras uretrales, 14 (28,58%) perianales y 11 (22,44%) endocervicales.

Con la técnica diferencial de fluorescencia descrita por Fazii *et al.* (7), se obtuvo que las cepas de referencia grampositivas no presentaron la coloración amarilla fluorescente y en las gramnegativas la intensidad de fluorescencia fue baja.

Al ajustarse la solución de fluoresceína a un pH de 6,5 las cepas de referencia grampositivas se observaron amarillas fluorescentes y las gramnegativas verdes fluorescentes. Al aplicarse la coloración diferencial de fluorescencia modificada a los frotis, los bacilos vistos como grampositivos por Gram presentaron una fluorescencia amarilla y en los bacilos gramnegativos su fluorescencia fue verde (Figs. 1 y 2).

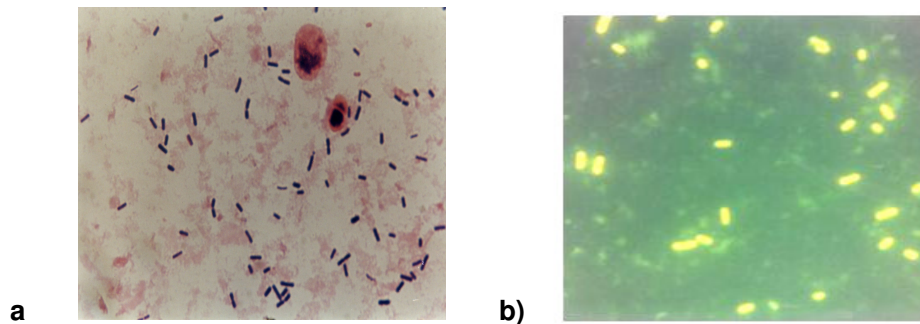


Fig. 1. Frotis de muestra endocervical teñidos por los métodos de coloración diferencial de Gram y de fluorescencia modificada. a). Método de Gram: bacilos grampositivos; b) método de fluorescencia: bacilos de color amarillo fluorescente.

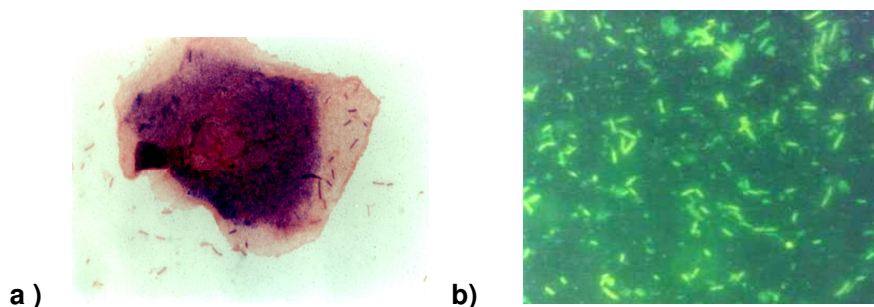


Fig. 2. Frotis de muestra endocervical teñidos por los métodos de coloración diferencial de Gram y de fluorescencia modificada. a) Método de Gram: bacilos gramnegativos; b) Método de fluorescencia: bacilos de color verde fluorescente.

En los frotis de secreciones uretrales y perianales donde se observó la morfología de diplococos, éstos emitieron una tinción por fluorescencia, anaranjado fluorescente (Fig. 3)

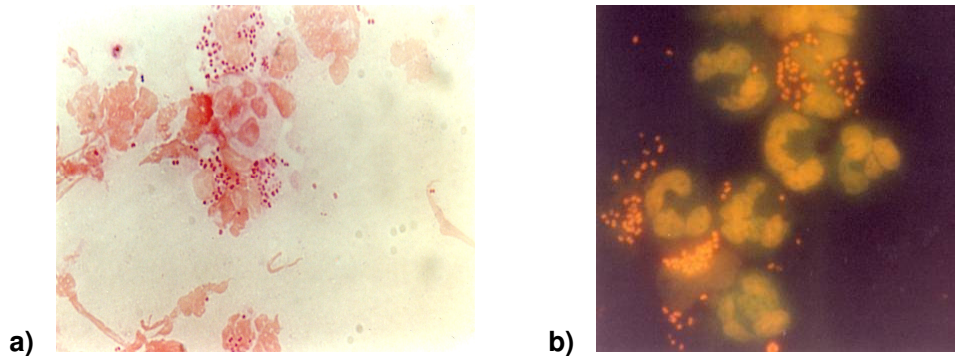


Fig. 3. Frotis de muestra uretral mostrando diplococos, teñidos por los métodos de Gram y de fluorescencia modificada. a) Método de Gram: diplococos gramnegativos intracelulares; b). Método de fluorescencia: diplococos intracelulares de color anaranjado fluorescente.

Por otra parte, con la técnica de fluorescencia modificada, el citoplasma de los leucocitos polimorfonucleares se visualizó de color amarillo o verde de fluorescencia baja y el núcleo anaranjado o amarillo de fluorescencia baja. Las células epiteliales se revelaron de color amarillo o verde fluorescente, con núcleo anaranjado o amarillo de fluorescencia baja (Fig. 4). El método de fluorescencia, mostró un buen contraste entre las bacterias coloreadas y el material de fondo, mejorando la visualización de bacterias ocultas por un material muy cargado de células epiteliales.

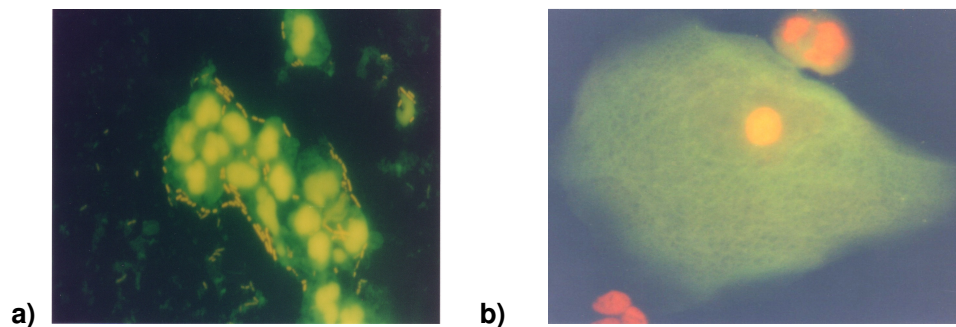


Fig.4. Leucocitos polimorfonucleares y célula epitelial sometidos al proceso de coloración diferencial de fluorescencia modificada. a) leucocitos polimorfonucleares con citoplasma verde de fluorescencia baja y núcleo amarillo fluorescente (los leucocitos se encuentran rodeados de bacilos amarillos fluorescentes); b) célula epitelial y leucocitos polimorfonucleares con citoplasma verde de fluorescencia baja y núcleo anaranjado.

Al comparar los métodos de coloración, el de fluorescencia permitió identificar mayor número de muestras con bacterias (Tabla 1)

Tabla 1. Coloración de Gram en la identificación de bacilos gramnegativos y método de fluorescencia modificada en la identificación de bacilos verdes fluorescentes en muestras uretrales, perianales y endocervicales.

Coloración	Tipo de muestra								
	Uretral			Perianal			Endocervical		
	+	-	T	+	-	T	+	-	T
Gram									
(n)	10	14	24	7	7	14	7	4	11
(%)	41,67	58,33	100,00	50,00	50,00	100,00	63,64	36,36	100,00
Fluorescencia									
(n)	15	9	24	8	6	14	9	2	11
(%)	62,50	37,50	100,00	57,14	42,86	100,00	81,82	18,18	100,00
p	<0,05*			>0,05 ns			<0,001*		

.En la identificación de bacilos gramnegativos y bacilos verdes fluorescentes tanto en muestras uretrales como endocervicales, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de casos positivos de ambos métodos

Los bacilos grampositivos por Gram, así como, los bacilos amarillos fluorescentes por el método de fluorescencia modificada sólo se visualizaron en los frotis endocervicales, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de casos positivos de estos dos métodos (Tabla 2).

Tabla 2. Coloración de Gram en la identificación de bacilos grampositivos y método de fluorescencia modificada en la identificación de bacilos amarillos fluorescentes en muestras uretrales, perianales y endocervicales.

Coloración	Tipo de muestra								
	Uretral			Perianal			Endocervical		
	+	-	T	+	-	T	+	-	T
Gram									
(n)	-	24	24	-	14	14	7	4	11
(%)	-	100,00	100,00	-	100,00	100,00	63,64	36,36	100,00
Fluorescencia									
(n)	-	24	24	-	14	14	9	2	11
(%)	-	100,00	100,00	-	100,00	100,00	81,82	18,18	100,00
p	-			-			<0,001*		

+: casos positivos; -: casos negativos; T: total de casos; *: estadísticamente significativo

A través de la coloración de Gram se obtuvo una frecuencia de diplococos gramnegativos en las muestras uretrales del 75%, siendo menor en las perianales. Por fluorescencia la identificación de diplococos visualizados como anaranjados fluorescentes fue mayor que en las muestras uretrales y menor en las perianales, encontrándose en ambos tipos de muestras diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes positivos de los métodos de coloración (Tabla 3).

Tabla 3. Coloración de Gram en la identificación de diplococos gramnegativos y método de fluorescencia modificada en la detección de diplococos anaranjados fluorescentes en muestras uretrales y perianales.

Coloración	Tipo de muestra					
	Uretral			Perianal		
	+	-	T	+	-	T
Gram (n)	18	6	24	4	10	14
(%)	75,00	25,00	100,00	28,57	71,43	100,00
Fluorescencia(n)	20	4	24	8	6	14
(%)	83,33	16,67	100,00	57,14	42,86	100,00
p	<0,001*			<0,001*		

En los frotis de muestras endocervicales coloreados por el método de fluorescencia, los diplococos se observaron verdes con baja fluorescencia en cuatro frotis y en un caso, se visualizaron anaranjados fluorescentes, existiendo diferencias significativas entre los porcentajes positivos por la coloración de Gram con respecto a los diplococos anaranjados fluorescentes y verdes ligeramente fluorescentes (Tabla 4).

Tabla 4. Coloración de Gram en la identificación de diplococos gramnegativos y método de fluorescencia modificada en la identificación de diplococos anaranjados y verdes fluorescentes en muestras endocervicales.

Característica tintorial	Coloración					
	Gram			Fluorescencia		
	+	-	T	+	-	T
Gramnegativo (n)	5	6	11	-	-	-
(%)	45,45	54,55	100,00	-	-	-
Anaranjado Fluores (n)	-	-	-	1	10	11
(%)	-	-	-	9,09	90,91	100,00
Verde con BJ (n)	-	-	-	4	7	11
(%)	-	-	-	36,36	63,64	100,00
p	$p_1 = <0,001^*$			$p_2 = <0,05^*$		

+: casos positivos; - casos negativos; T: total de casos; BJ: baja fluorescencia; p_1 : valor para los porcentajes de casos positivos entre diplococos gramnegativos y diplococos anaranjados fluorescentes; p_2 : valor p para los porcentajes de casos positivos entre diplococos gramnegativo y diplococos verdes de baja fluorescencia; *: estadísticamente significativo.

DISCUSIÓN

La técnica de coloración de fluorescencia identificó bacterias con diferentes tinciones, los bacilos amarillos fluorescentes fueron vistos como grampositivos por el método de Gram, los bacilos verdes fluorescentes correspondieron a los bacilos gramnegativos observados por Gram y los diplococos anaranjados fluorescentes y verdes de baja fluorescencia a los diplococos gramnegativos. No obstante, con la tinción modificada de fluorescencia sería confuso utilizar la terminología de grampositivos y gramnegativos, tal como la emplean Fazii *et al.* (7) al exhibirse otro color, como el anaranjado. De acuerdo a estos resultados se sugiere utilizar la denominación de la característica tintorial según el color e intensidad de fluorescencia observada.

La emisión de fluorescencia anaranjada en los diplococos se puede explicar sobre la base de la expresión genética durante el ciclo celular bacteriano, naturaleza química del colorante y mecanismos de tinción.

El naranja de acridina es un colorante catiónico y metacromático, que emite fluorescencia cuando interactúa con el ADN y ARN, desconociéndose los mecanismos moleculares que la median. En el ADN, el naranja de acridina se intercala, produciendo una coloración verde fluorescente, y con el ARN interactúa por atracción electrostática, expresando una tonalidad anaranjada fluorescente (10-12).

Heckels (13) señala que las especies del género *Neisseria* presentan una superficie celular de carga negativa, pudiéndose inferir que es posible que se produzca en un inicio una atracción electrostática entre el colorante naranja de acridina de carga positiva y la superficie celular bacteriana de carga negativa, potenciándose la fijación del colorante en aquellas bacterias que presentan una síntesis activa de ARN, es decir, en el proceso de transcripción, fase de expresión de ARN. El fluorocromo naranja de acridina doble sal hemi, $C_{17}H_{20}ClN_3 \cdot HCl \cdot 1/2ZnCl_2$, (14), contiene una sal metálica, cloruro de zinc, que actuaría como el grupo auxocromo del colorante (15). Es probable que esta sal metálica le confiera a la molécula de naranja de acridina un carácter fuertemente básico y mayor afinidad por estructuras de carga negativa, como los ácidos nucleicos de la célula, impidiendo la remoción del colorante naranja de acridina con el alcohol-acetona, en aquellas donde la síntesis de ARN sea mayor, así la fluoresceína a baja concentración no ejercería el efecto diferencial, adquiriendo por lo tanto una coloración anaranjada fluorescente.

Por otro lado, las bacterias que no se encuentran en síntesis de ARN son decoloradas completamente tras la aplicación del alcohol-acetona, manifestando una tinción verde fluorescente o de baja fluorescencia, pudiendo explicar esto, lo ocurrido en las muestras endocervicales y en el resto de los frotis de las otras muestras donde se visualizaron bacilos. Puede inferirse que las bacterias con tinción amarilla, el naranja de acridina es removido parcialmente, pudiendo este hecho estar relacionado con una síntesis no tan activa de ARN y que al incorporar la fluoresceína de sodio se forma el sistema rojo/verde.

Estas inferencias contrastan con la hipótesis de Fazii *et al.* (7), quienes la apoyan con los trabajos de Mitra y Chakraborty (16,17) y Drigues *et al.* (18), señalando que el naranja de acridina interactúa con los polisacáridos y lipopolisacáridos de la pared celular y que probablemente el alcohol-acetona desestabiliza la membrana externa rica en lipopolisacáridos de las bacterias gramnegativas, removiendo parcialmente el colorante de estas bacterias.

Las bacterias que son más resistentes a la decoloración (grampositivas) retendrán una cantidad suficiente de naranja de acridina y aparecen amarillas cuando al fluorocromo rojo es añadido la fluoresceína verde, formando juntos el sistema rojo/verde. En contraste, las bacterias que son poco resistentes a la decoloración (gramnegativas) no retienen suficiente el naranja de acridina y aparecen verdes.

La técnica de coloración de fluorescencia modificada identificó mayor número de bacterias con diferencia estadísticamente significativa entre los

porcentajes de casos positivos de los métodos de coloración, destacándose, la obtenida en la detección de diplococos gramnegativos y diplococos anaranjados fluorescentes en las muestras uretrales y perianales, teniendo esto importancia en el diagnóstico presuntivo de la gonorrea, porque se estaría ante una herramienta que posiblemente podría identificar de un modo selectivo a los diplococos, sin embargo, en las mujeres, aunque se obtuvo diferencia estadística entre los porcentajes de los métodos, la frecuencia de casos presuntivos basados en la observación de diplococos anaranjados fluorescentes sería bajo.

La coloración de fluorescencia, probablemente, permita distinguir por microscopía óptica la expresión genética de los diplococos, referida, principalmente, al proceso de transcripción de ARN durante su ciclo celular. De modo que, considerando este hallazgo, así como la importancia que tiene el diagnóstico de la gonorrea, esto representa una contribución significativa para proseguir con estudios que evalúen por microscopía las características tintoriales con las coloraciones de Gram y fluorescencia, acompañadas por técnicas de cultivos, moleculares y microscopía electrónica, a fin de aportar más datos referentes a la fisiología, ultraestructura y mecanismos de patogenicidad de los gonococos y otras bacterias.

Financiamiento: Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente . CI-2-040102-1284/06

Agradecimientos. Se agradece a la Dra. Mireya Acuña de Villafañe, Médico Jefe de la Consulta ITS-SIDA del Ambulatorio "Dr. Arquímedes Fuentes Serrano", por la colaboración prestada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Bailey & Scott. Diagnóstico microbiológico. Undécima edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires 2004.
2. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires 1999.
3. Moore S, Miller W, Hoffman I, Fox K, Owen J, McPerson J, Privette A, Schmitz J, Leone P. Clinical utility of measuring white blood cells on vaginal wet mount and endocervical Gram stain for the prediction of chlamydial and gonococcal infections. Sex Transm Dis 2000;27:530-538.
4. Geisler W, Yu S, Hook E. Chlamydial and gonococcal infection in men without polymorphonuclear leukocytes on Gram stain: Implications for diagnostic approach and management. Sex Transm. Dis 2005;32: 630-634.
5. Manavi K, Young H, Clutterbuck D. Sensitivity of microscopy for the rapid diagnosis of gonorrhoea in men and women and the role of gonorrhoea serovars. Int. J STD AIDS 2003;14:390-394.
6. Ison C, McLean K, Gedney J, Munday P, Coghill D, Smith R, Harris J, Easmon C. Evaluation of a direct immunofluorescence test for diagnosing gonorrhoea. J Clin Pathol 1985;38:1142-1145.
7. Fazii P, Ciancaglini E, Sforza R. Differential fluorescent staining method for detection of bacteria in blood cultures, cerebrospinal fluid and other clinical specimens. Eur J Clin Microb & Inf Dis 2002; 21:373-378.
8. Ciancaglini E, Fazii P, Sforza G. The use of a differential fluorescent staining method to detect bacteriuria. Clin Lab 2004;50:685-688.
9. De Abajo F. La Declaración de Helsinki VI. Rev Esp Salud Pública 2001;75:407-442.
10. Conn H. Biological stains. Séptima edición. The Williams & Wilkins Company. Baltimore 1961.
11. Darzynkiewicz Z. Differential staining of DNA and RNA in intact cells and isolated cell nuclei with acridine orange. Meth Cell Biol 1990;33:285-298.

12. Nishiwaki H, Ogura Y, Kimura H, Kiryu J, Honda Y. Quantitative evaluation of leukocyte dynamics in retinal microcirculation. *Inves Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36:123-129.
13. Heckels J. Structure and function of pili of pathogenic *Neisseria* species. *Clin. Microbiol. Rev* 1989;2:S66-S73.
14. Sigma-Aldrich. Biochemicals & Reagents, for life science research. Sigma. Saint Louis, USA. 2004-2005; p.58-59.
15. García R. Manual de laboratorio clínico diagnóstico. Anatomía patológica. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Bogotá. 2000; p.651-652.
16. Mitra A, Chakraborty AK. Absorption and fluorescence studies on interaction between cationic dyes and *Klebsiella* K7 capsular polysaccharide. *Indian J Biochem Biophys* 1992;29:291-295.
17. Mitra A, Chakraborty AK. Spectrophotometric and spectrofluorometric studies on interaction of cationic dyes with bacterial capsular polysaccharide. *Indian J Biochem Biophys* 1998;35:241-246.
18. Drigues P, Demery-Lafforgue D, Trigalet A, Dupin P, Samain D, Asselineau J. Comparative studies of lipopolysaccharide and exopolysaccharide from a virulent strain of *Pseudomonas solanacearum* and from three avirulent mutants. *J Bacteriol* 1985;162:504-509.



Sociedad Venezolana
de Infectología



Sociedad Venezolana
de Microbiología

VIII Congreso Venezolano de Infectología “Dr. Iván Brito”

**IX Congreso Venezolano de Microbiología
“Dra. María De Lourdes González”**

XVIII Jornadas Carabobeñas de Infectología

III Workshop Latinoamericano Helicobacter pylori 2008

Valencia, 12 - 15 de Noviembre 2008

**Hotel Suite Ucaima y Hotel Intercontinental
Tacarigua – Valencia, Edo. Carabobo**

Para mayor información, Contacto: CONGREX
Teléfono: (+58) 0212 - 263.9733 (12 Líneas)
Página Web Relacionada: <http://www.svinfectologia.org>
e-mail: infecto-micro2008@congrex.com