

ARTICULO

Tinción diferencial de fluorescencia modificada en el diagnóstico de *N. gonorrhoeae* y correlación clínico-tintorial del diplococo.

Evelin M. Flores F., Luzmila S. Albarado Y.

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

Correspondencia: Evelin Flores

E-mail: evelflores@cantv.net

Financiamiento: Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente.

Recibido: Febrero 2009 **Aprobado:** Agosto 2009

RESUMEN

El objetivo fue evaluar la tinción diferencial de fluorescencia modificada en el diagnóstico de gonorrea en muestras perianales y uretrales, y correlacionar las características tintoriales por fluorescencia del diplococo en frotis con la sintomatología. Se tomaron muestras perianales y uretrales de hombres para frotis y cultivo bacteriológico. La tinción diferencial de fluorescencia, identificó diplococos en muestras perianales y uretrales con diferentes tinciones e intensidades de fluorescencia. Los pacientes con infección rectal, fueron asintomáticos. La tinción de fluorescencia fue altamente sensible (100%) en la identificación de gonococos en frotis perianales, así como el Gram y la especificidad fue alta (86%), al ser comparada con el Gram (36%) con diferencias estadísticamente significativas. El 75% de los pacientes manifestó uretritis sintomática, en éstos, los valores de sensibilidad y especificidad de la tinción de fluorescencia fueron similares al Gram (100%). En los individuos asintomáticos, la sensibilidad por ambos métodos resultó semejante, (100%) y aunque los valores de especificidad fueron bajos, la coloración de fluorescencia (67%), superó al Gram (50%), con diferencias estadísticamente significativas. La coloración de fluorescencia tuvo mayor capacidad discriminativa en asintomáticos (perianal=93%; uretral= 83%) que el Gram (perianal=68%; uretral = 75%). Se obtuvo una correlación estadísticamente significativa entre la observación de diplococos verdes no fluorescentes en frotis uretrales y la presencia de sintomatología. La coloración de fluorescencia representa una contribución significativa como herramienta en el diagnóstico de gonorrea en muestras perianales y uretrales. El uso de las curvas COR permitió valorar mejor los métodos de coloración en el diagnóstico de gonorrea rectal y uretral, teniendo la coloración de fluorescencia mayor capacidad discriminativa que el Gram, especialmente, en los pacientes asintomáticos, lo que sería importante para el control de la enfermedad.

Palabras Clave: Coloración diferencial de fluorescencia modificada, muestras perianales y uretrales, sensibilidad, especificidad, curvas COR.

ABSTRACT

The modified differential fluorescent staining method for diagnosing *n. gonorrhoeae*, and clinical-dye correlation of the diplococcus

The objective of this study was to evaluate the modified differential fluorescent staining method for diagnosing gonorrhea in perianal and urethral specimens, and to correlate the characteristics of the fluorescent dye of the diplococcus in smears with symptoms. The perianal and urethral specimens were collected from men with two swabs for both smear and bacteriological culture. The modified differential fluorescent staining identified diplococcus in perianal and urethral specimens with different dyes and intensities of fluorescence. Patients with rectal infection, showed no symptoms. The modified fluorescent staining was highly sensitive (100%) in identifying gonococcus in perianal smears, as well as Gram, and specificity was high (86%) as compared with Gram (36%), with statistically significant differences. 75% of symptomatic patients presented urethritis. Values for sensitivity and specificity of the modified differential fluorescent staining method in the latter were similar to Gram (100%). In asymptomatic individuals, sensitivity for both methods was similar (100%) and, although specificity values were low, the modified differential fluorescent staining method (67%) outperformed the Gram (50%), with statistically significant differences. Fluorescent staining has a more discriminatory capacity in asymptomatic patients (perianal=93%; urethral=83%) than Gram (perianal=68%; urethral = 75%). There was a statistically significant correlation between the observation green non-fluorescent diplococcus in urethral smears and the presence of symptoms. The modified differential fluorescent staining method is an excellent tool for the diagnosis of gonorrhea in perianal and urethral specimens, The use of ROC curves allowed the assessment of the best staining methods for diagnosing rectal and urethral gonorrhea, the modified differential fluorescent staining method showing more discriminatory capacity than Gram, especially in asymptomatic patients, which is very important for controlling the disease.

Key words: differential fluorescent staining method, perianal and urethral specimens, sensitivity, specificity, ROC curves.

INTRODUCCIÓN

La gonorrea, actualmente, es una de las infecciones de transmisión sexual que afecta a más personas a nivel mundial. En mujeres y en la mayoría de los casos de infección rectal en hombres homosexuales, es asintomática, representando un reservorio de portadores asintomáticos que desconocen que pueden transmitir la enfermedad a sus contactos sexuales, siendo así, por lo tanto, uno de los dos factores responsable de la alta prevalencia de gonorrea, además, la infección gonocócica rectal actúa como un factor de riesgo para la transmisión del virus de inmunodeficiencia humana. En los hombres *N. gonorrhoeae*, habitualmente, causa síntomas de uretritis (1-4).

Los métodos de diagnóstico de infección por *N. gonorrhoeae* están constantemente en evolución, permitiendo no sólo diagnosticar y tratar al paciente, sino examinar a la población asintomática, lo cual es importante para controlar la transmisión de la enfermedad, determinar la incidencia y prevalencia con propósitos epidemiológicos (5).

El diagnóstico presuntivo de infección por *N. gonorrhoeae* en hombres sintomáticos, se realiza a partir de frotis de exudados uretrales coloreados por Gram, al observarse los típicos diplococos gramnegativos dentro de leucocitos polimorfonucleares. La coloración de Gram es una herramienta clave para el diagnóstico de uretritis gonocócica en hombres, porque su sensibilidad y especificidad son altas, representando el 95% y 97%, respectivamente (1,6).

Publicaciones recientes señalan que el estudio microscópico en el diagnóstico de gonorrea en muestras endocervicales y rectales, es una herramienta importante que incrementa el número de pacientes diagnosticados y tratados en su primera visita, evitándose así una mayor propagación de la enfermedad y sus complicaciones (7,8).

La implementación de coloraciones diferenciales de fluorescencia, en la evaluación microscópica, se inicia desde que Kronvall y Myhre (9), introdujeron el fluorocromo naranja de acridina para la detección de bacterias, considerándose la coloración con naranja de acridina una alternativa valiosa en la identificación de diplococos en frotis uretrales y cervicales, debido a su alto contraste entre las bacterias y el material de fondo. Luego, Fazii *et al.* (10), diseñaron una técnica de coloración diferencial de fluorescencia utilizando dos fluorocromos: naranja de acridina y fluoresceína, las bacterias grampositivas se tiñen de amarillo fluorescente y las gramnegativas de verde fluorescente.

Los investigadores la aplicaron en extendidos de secreciones uretrales de pacientes con cultivos positivos para *N. gonorrhoeae*, los gonococos se visualizaron verdes fluorescentes, fueron identificados en todos los frotis y la sensibilidad fue altamente significativa con respecto al Gram. Pocos estudios han evaluado este método, Flores *et al.* (11) publican un estudio en frotis de secreciones genitales, que evalúa el método diferencial de fluorescencia con modificación en el pH de la solución de fluoresceína, obteniendo que los diplococos emitieron una tinción distinta, observándose anaranjados fluorescentes. En base a esta variación en el color, la coloración diferencial de fluorescencia podría ser aprovechada como una herramienta selectiva en el diagnóstico de gonorrea, pudiendo ser oportuna ante el conocimiento de la dificultad de identificar individuos asintomáticos, de modo que, el objetivo fue evaluar la coloración diferencial de fluorescencia modificada en el diagnóstico de gonorrea en muestras perianales y uretrales y correlacionar las características tintoriales por fluorescencia del diplococo en frotis con la presencia de sintomatología.

METODOS

Muestra poblacional. Se seleccionaron por muestreo a conveniencia un total de 37 pacientes del sexo masculino, con sospecha clínica y noción epidemiológica de infección por *N. gonorrhoeae*, los cuales acudieron a la consulta del área de Infecciones de Transmisión Sexual (ITS-SIDA) del ambulatorio “Dr. Arquímedes Fuentes Serrano”, Cumaná, estado Sucre, durante el período comprendido entre julio-2007 y febrero-2008. Se consideró como criterio de exclusión, descartar aquellos pacientes bajo tratamiento con antibióticos o haberlo recibido 72 horas previas a la toma de muestra.

Toma de muestra. La muestra estuvo representada por 21 secreciones uretrales, procedentes de hombres heterosexuales y 16 perianales, que provinieron de hombres homosexuales. La recolección de las muestras fue realizada 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 (12). A cada paciente incluido en el estudio, se le tomaron dos hisopados, el primero destinado a la elaboración de frotis y el segundo para el cultivo bacteriológico, el cual se colocó en medio de transporte Amies con carbón

activado (Difco, USA). Los frotis se elaboraron en la consulta de ITS-SIDA, empleando láminas nuevas, limpias y desgrasadas. Dos frotis se destinaron para el Gram y dos para la tinción diferencial de fluorescencia modificada. Posteriormente, los frotis y muestras en los medios Amies fueron trasladados al laboratorio de Histología y Microbiología del Departamento de Bioanálisis de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, para realizar las respectivas técnicas de coloración y estudio bacteriológico. Los medios Amies, se trasladaron por un tiempo no mayor a tres horas una vez obtenida la muestra (13).

Coloración de Gram El procedimiento de coloración fue realizado según la técnica de Hucker modificada (13). Cada una de las láminas coloreadas con la técnica convencional de Gram, se observaron con el microscopio óptico, con una amplificación de 1000x, identificando las bacterias presentes en los frotis de acuerdo a sus características morfológicas y tintoriales. Las fotografías fueron tomadas con una cámara Kodak, usando una película Kodak Gold 35 mm de 100 ASA, en modo auto, spot 1,0 y tiempo de exposición de 1 segundo.

Tinción diferencial de fluorescencia modificada. La lámina preparada se cubrió con una solución de naranja de acridina (Sigma-Aldrich, USA) al 0,7% en buffer acetato pH 4,0, durante dos minutos, luego, se lavó con agua de chorro y se procedió a decolorar con alcohol-acetona (1:1), exactamente, por diez segundos, inclinando la lámina en un ángulo aproximado de 45°, se enjuagó nuevamente; se aplicó la solución de fluoresceína de sodio (Sigma-Aldrich, USA) a una concentración de 0,002% en alcohol etílico pH 6,5, por dos minutos y se eliminó el colorante con agua. Se dejó secar para su observación microscópica (11). Las láminas coloreadas se observaron con un microscopio de epifluorescencia marca Olympus BX 60, utilizando el filtro azul, el cual es un cubo que incluye un filtro de excitación azul de banda amplia de 450-480 nm, espejo dicromático de 500 nm y un filtro de barrera de 515 nm. Las láminas se observaron con aumento de 1000x. Las fotografías fueron tomadas con una cámara Kodak, usando una película Kodak Gold de 35 mm de 100 ASA, en modo superfluorescencia, spot 1,0 y tiempo de exposición de 15 a 55 segundos.

Controles empleados. Como control para bacterias grampositivas se empleó *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y para gramnegativas se usó *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226. Con estas cepas de referencia se realizaron extendidos a partir de cultivos de 24 horas y se tiñeron con las técnicas de coloración de Gram y fluorescencia.

Siembra, aislamiento e identificación. Una vez trasladadas las muestras al laboratorio, los hisopos con las muestras se inocularon rodándolos en forma de Z sobre el medio selectivo gonococo (GC, Difco, USA), luego con asa de platino estéril se realizó un estriado perpendicular sobre las líneas de la siembra, con el fin de identificar colonias de *N. gonorrhoeae* en la zona periférica del medio, lejos del área de inoculación primaria de la muestra. Las placas sembradas se colocaron en una jarra con vela, a una temperatura de 37°C, inspeccionando los medios a las 24, 48 y 72 horas de incubación (14). La identificación de *N. gonorrhoeae*, se realizó según lineamientos sugeridos por Koneman *et al.* (13) y Forbes *et al.* (15), incluyéndose identificación macroscópica y microscópica de las colonias, las pruebas oxidasa, catalasa, superoxol y utilización de hidratos de carbonos.

Análisis estadístico. Se determinó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para los métodos de coloración Gram y fluorescencia, utilizando como método de referencia el cultivo, los cálculos se realizaron según Ison *et al.* (16):

Sensibilidad. Número de pacientes con gonorrea e identificación en frotis de diplococos por el método de coloración evaluado (Gram/fluorescencia) / Número total de pacientes con gonorrea.

Especificidad. Número de pacientes sin gonorrea y sin identificación en frotis de diplococos por el método de coloración evaluado (Gram/fluorescencia) / Número total de pacientes sin gonorrea.

Valor predictivo positivo. Número de pacientes con identificación en frotis de diplococos por el método de coloración evaluado (Gram/fluorescencia) y con gonorrea / Número total de pacientes con identificación en frotis de diplococos por el método de coloración evaluado (Gram/fluorescencia).

Valor predictivo negativo. Número de pacientes sin identificación en frotis de diplococos por el método de coloración evaluado (Gram/fluorescencia) sin gonorrea / Número total de pacientes sin identificación en frotis de diplococos por el método de coloración evaluado (Gram/fluorescencia).

Asimismo, se aplicó la prueba chi-cuadrado para determinar si existen diferencias significativas entre los porcentajes de especificidad de los métodos de coloración comparados. Así como también, se construyeron curvas de operación característica del receptor (COR) para evaluar el poder discriminatorio entre los dos métodos de coloración en el diagnóstico de gonorrea rectal y uretral. Por otra lado, se aplicó un análisis de múltiples variables para establecer correlación entre las características tintoriales de los diplococos por fluorescencia y sintomatología a un nivel de confiabilidad del 95% (17,18). Para el análisis se usó el software estadístico SPSS.

RESULTADOS

En el estudio microscópico de los frotis, a través de la coloración diferencial de fluorescencia, se obtuvo que en los procedentes de muestras perianales, los diplococos se observaron anaranjados fluorescentes y verdes fluorescentes o ligeramente fluorescentes, mientras que en los frotis uretrales los diplococos emitieron fluorescencia anaranjada y se observaron verdes no fluorescentes (Figura 1).

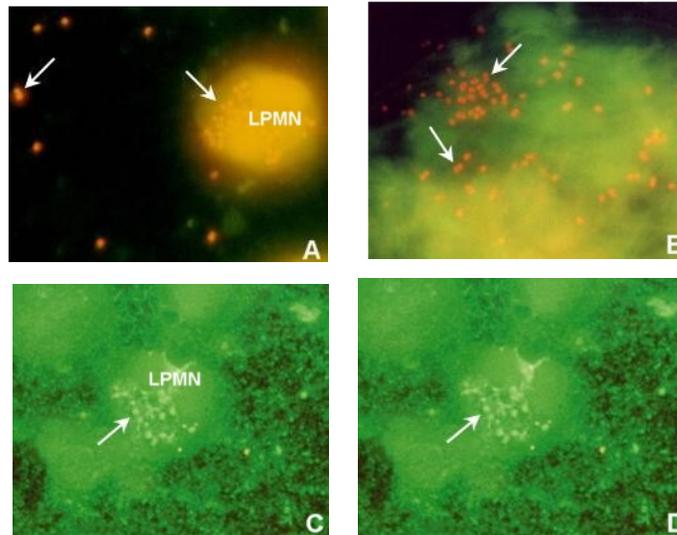


Figura 1. Microfotografías de frotis uretrales, teñidos por la coloración de fluorescencia. **A-B.** Diplococos anaranjados fluorescentes (flechas) dentro de leucocito polimorfonuclear (LPMN) amarillo fluorescente y envueltos por material de secreción. 1000x. **C-D.** Diplococos verdes no fluorescentes (flechas) en el interior de leucocito polimorfonuclear (LPMN) y extracelulares. 1000x.

El cultivo bacteriológico permitió el diagnóstico de 14 (37%) casos de gonorrea, de los cuales 2 (5%) fueron a partir de muestras perianales y 12 (32%) de muestras uretrales (Figura 2).

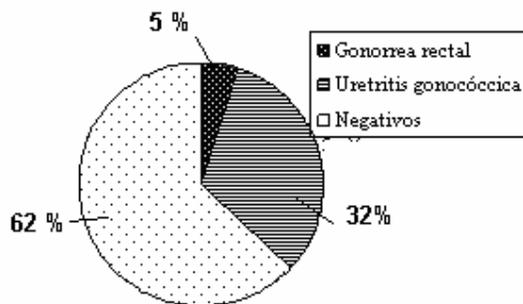


Figura 2. Casos de infección por *N. gonorrhoeae*

Los pacientes con infección rectal, no manifestaron sintomatología. De los hombres con infección uretral, el 75% (9/12) presentó sintomatología uretral, caracterizada por secreción mucopurulenta con o sin dolor al orinar.

La coloración de fluorescencia en el diagnóstico de gonoreea rectal, en función a la observación tanto de diplococos anaranjados y verdes en frotis perianales, mostró igual sensibilidad, 100% y mayor especificidad, 86%, que

la coloración de Gram, 36%, existiendo diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre los porcentajes de especificidad. En pacientes con sintomatología uretral, los valores de sensibilidad y especificidad de las coloraciones Gram y fluorescencia fueron similares, 100%. En los individuos con uretritis asintomática, aunque la sensibilidad por ambas técnicas de coloración fueron, igualmente del 100%, los valores de especificidad fueron bajos, mejorando este valor en la coloración de fluorescencia, 67%, con respecto al método de coloración de Gram, 50% y existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ambos (Tabla 1).

Tabla 1. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de las coloraciones diferenciales de Gram y fluorescencia con respecto al cultivo, en el diagnóstico de gonorrea en muestras perianales y uretrales.

Gonorrea rectal				
Coloración	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
Gram	100	36*	18	100
Fluorescencia	100	86*	50	100
Uretritis gonocócica				
Coloración	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
Gram:				
Sintomáticos	100	100	100	100
Asintomáticos	100	50*	50	100
Fluorescencia:				
Sintomáticos	100	100	100	100
Asintomáticos	100	67*	60	100

VPP: valor predictivo positivo; **VPN:** valor predictivo negativo; *: diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Al evaluar los métodos de coloración, Gram y fluorescencia, mediante las curvas COR, se obtuvo que la tinción de fluorescencia tuvo un alto poder discriminatorio (área bajo la curva= 0,929; significación= 0,057; intervalo de confianza= 0,795-1,063); más no la coloración de Gram (área bajo la curva= 0,679; significación= 0,427; intervalo de confianza= 0,352-1,005), en el diagnóstico de gonorrea rectal (Figura 3).

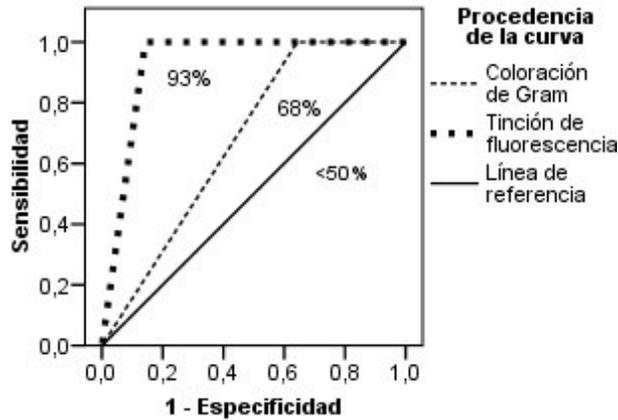


Figura 3. Comparación de las curvas COR de los métodos de coloración Gram y fluorescencia en el diagnóstico de gonorrea rectal.

Con respecto a los pacientes con sintomatología uretral, tanto la coloración de fluorescencia y Gram (área bajo la curva= 1,000; significación= 0,013; intervalo de confianza= 1,000-1,000) presentaron un poder discriminatorio perfecto. En la coloración de fluorescencia, la visualización de diplococos anaranjados fluorescentes y verdes no fluorescentes, tuvieron iguales y altos valores discriminatorios (área bajo la curva= 0,889%; significación= 0,052; intervalo de confianza: 0,696-1,079), en el diagnóstico de gonorrea uretral sintomática (Figura 4).

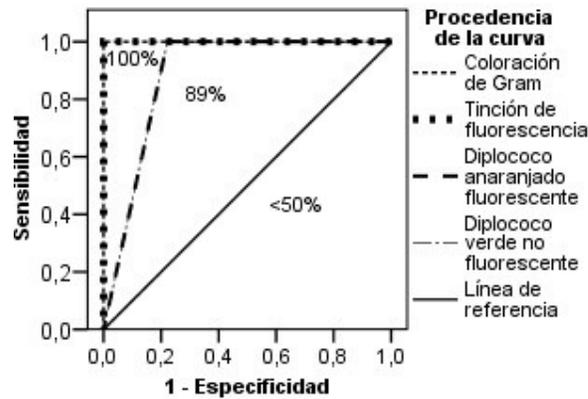


Figura 4. Comparación de las curvas COR de los métodos de coloración Gram y fluorescencia en el diagnóstico de gonorrea uretral en pacientes sintomáticos.

En los pacientes sin sintomatología uretral, la tinción de fluorescencia tuvo alto poder discriminatorio (área bajo la curva= 0,833; significación= 0,121; intervalo de confianza= 0,559-1,107), no así el método de Gram (área bajo la curva= 0,750; significación= 0,245; intervalo de confianza= 0,423-1,077). En la coloración de fluorescencia la observación de diplococos anaranjados fluorescentes presentó alto valor discriminatorio (área bajo la curva= 0,833; significación= 0,121; intervalo de confianza= 0,559-1,107), no obstante, los diplococos verdes no fluorescentes no presentaron poder discriminatorio (área bajo la curva= 0,500; significación= 0,215; intervalo de confianza= 0,078-0,922), en el diagnóstico de gonorrea uretral asintomática (figura 5).

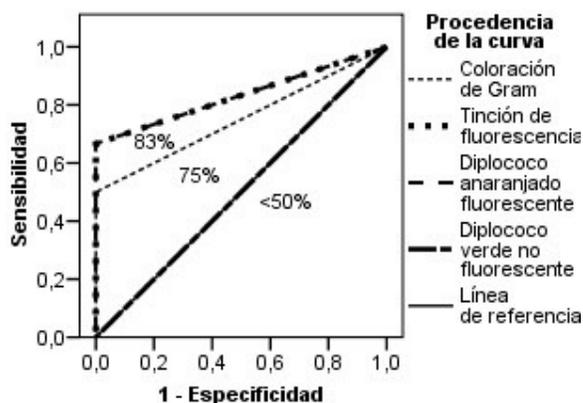


Figura 5. Comparación de las curvas COR de los métodos de coloración Gram y fluorescencia en el diagnóstico de gonorrea uretral en pacientes asintomáticos.

Al correlacionar la presencia o ausencia de sintomatología en pacientes con cultivo positivo, con respecto a las características tintoriales que presentaron los diplococos en los frotis uretrales por la coloración de fluorescencia, se obtuvo que los diplococos verdes no fluorescentes (100%), se observaron en los pacientes con sintomatología. De acuerdo al análisis de múltiples variables existió una correlación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre la observación de diplococos verdes no fluorescentes y la presencia de sintomatología, sin embargo, no se encontró correlación estadísticamente significativa entre la identificación de diplococos anaranjados fluorescentes y la presencia de síntomas ($p > 0,05$) (Tabla 2).

Tabla 2. Correlación entre las características tintoriales de los diplococos en frotis uretrales por la coloración de fluorescencia y la presencia de sintomatología, en pacientes con cultivo positivo.

Sintomatología	Característica tintorial de los diplococos por el método de coloración de fluorescencia			
	Verde no fluorescente		Anaranjado fluorescente	
	Sí	No	Sí	No
Sí	6 (100%)	3 (50%)	7 (70%)	2 (100%)
No	0 (0%)	3 (50%)	3 (30%)	0 (0%)
Total	6 (100%)	6 (100%)	10 (100%)	2 (100%)
	* $p=0,04 < p=0,05$		$p=0,42 > p=0,05$	

*: estadísticamente significativo

DISCUSIÓN

La técnica de coloración de fluorescencia, identificó diplococos en los frotis uretrales con diferentes tinciones e intensidades de fluorescencia. Las

variaciones de color y emisión de fluorescencia en los diplococos, puede explicarse sobre la base de la expresión genética durante el ciclo celular bacteriano, naturaleza química del colorante naranja de acridina y mecanismos de tinción (11).

La coloración de fluorescencia en el diagnóstico de gonorrea rectal y uretritis gonocócica, mostró igual sensibilidad, 100% y mayor especificidad que la coloración de Gram. Se ha señalado que la coloración de Gram en el diagnóstico de *N. gonorrhoeae*, en frotis rectales no es apropiado debido a la presencia de otros microorganismos que interfieren con la observación del gonococo o semejan diplococos (19). Además, se han reportado ocasionalmente, aislamientos de otras especies de *Neisseria* a partir de muestras anales.

En los pacientes con uretritis sintomática los métodos diferenciales de coloración, Gram y fluorescencia, proporcionaron un resultado similar. Los resultados de la tinción de Gram, se ajustan a los que reportan los Centros de Control y Prevención de las Enfermedades, en su publicación sobre las pruebas de screening para detectar infección por *N. gonorrhoeae* del año 2002, citando que en frotis de secreciones uretrales de pacientes sintomáticos, la sensibilidad y especificidad de la coloración de Gram es comparable al cultivo (1). En los individuos asintomáticos, la sensibilidad fue alta (100%), no obstante, los valores de especificidad fueron bajos, tanto por Gram como por fluorescencia y aunque estos valores estuvieron disminuidos, se obtuvo diferencias estadísticamente significativas entre ellos, superando la coloración de fluorescencia al Gram. De acuerdo, a la publicación de los Centros de Control y Prevención de las Enfermedades (1), hasta ahora, la sensibilidad y especificidad de la coloración de Gram, en frotis uretrales de pacientes asintomáticos no se han determinado.

Aunque la sensibilidad, especificidad y valores predictivos han sido usados como indicadores de la exactitud de una prueba, no son suficientes para valorar la eficiencia de los métodos de diagnósticos, recomendándose el empleo adicional de curvas COR, las cuales superan las limitaciones de los índices tradicionales (18,20). El uso de las curvas COR en el presente estudio permitió comparar los métodos de coloraciones en el diagnóstico de gonorrea rectal y uretral, evaluándose mejor la capacidad que presentan ambos métodos de coloración para discriminar entre los individuos enfermos y sanos, obteniéndose que la coloración de fluorescencia tuvo alta capacidad discriminatoria que el Gram; hasta ahora no existe cita bibliográfica que permita comparar los resultados del presente estudios con otras investigaciones.

La correlación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre la observación de diplococos verdes no fluorescentes en frotis uretrales y la presencia de sintomatología, sugiere, que los diplococos verdes no fluorescentes, puedan representar una fase virulenta de la bacteria. En la década de los años sesenta, la virulencia de *N. gonorrhoeae* se asocia, por primera vez, con las variaciones morfológicas de las colonias. Fueron los trabajos de Kellogg *et al.* (21,22) los que demostraron la fuerte correlación entre el grado de virulencia de *N. gonorrhoeae* presentado *in vivo* y la morfología de las colonias; describiendo cinco tipos de colonias. En la actualidad, se conoce que estas variaciones en las morfologías de las colonias ocurren por cambios en las proteínas de la membrana externa y también por la presencia o ausencia de pili en la superficie celular, los cuales participan en la

adherencia del microorganismo a las superficies celulares del hospedero (23).

Conclusión. La coloración de fluorescencia representa una contribución significativa como herramienta en el diagnóstico de gonorrea en muestras perianales y uretrales. El uso de las curvas COR permitió valorar mejor los métodos de coloración en el diagnóstico de gonorrea rectal y uretral, teniendo la coloración de fluorescencia, en los pacientes asintomáticos, una gran capacidad para discriminar, más no, el método de Gram, lo que sería importante para el control de la enfermedad.

Agradecimientos. A la Dra. Mireya Acuña, jefa del área de Infecciones de Transmisión Sexual del ambulatorio “Dr. Arquímedes Fuentes Serrano”, a las enfermeras Natalí, Luz Marina e Ingrid quienes gratamente colaboraron en la atención al paciente y toma de muestras y al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, por el aporte financiero del proyecto codificado con el número CI-2-040102-1284/06.

BIBLIOGRAFÍA

1. CDC: Centers for Disease Control and Prevention. Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections. MMWR 2002; 51(RR15):1-27.
2. Craib K, Meddings D, Strathdee S, Hogg R, Montaner J, O'Shaughnessy M, Schechter M. Rectal gonorrhoea as an independent risk factor for HIV infection in a cohort of homosexual men. Genitourin Med 1995; 71(3):150-154.
3. Young H, Manavi K, McMillan A. Evaluation of ligase chain reaction for the non-cultural detection of rectal and pharyngeal gonorrhoea in men who have sex with men. Sex Transm Infect 2003; 79:484-486.
4. Khaki P, Bhalla P, Sharma P, Chawla R, Bhalla K. Epidemiological analysis of *Neisseria gonorrhoeae* isolates by antimicrobial susceptibility testing, auxotyping and serotyping. Indian J Med Microbiol 2007; 25(3): 225-229.
5. Lai-King Ng, Martin I. The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*. Can J Infect Dis Med Microbiol 2005; 16(1):15-25.
6. Unemo M, Savicheva A, Budilovskaya O, Sokolovsky E, Larsson M, Domeika M. Laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* in St Petersburg, Russia: inventory, performance characteristics and recommended optimisations. Sex Transm Infect 2006; 82(1): 41-44.
7. Grover D, Prime K, Prince M, Ridgway G, Gilson R. Rectal gonorrhoea in men: is microscopy still a useful tool? Int J STD AIDS 2006; 17(4): 277-279.
8. Forbes K, Vaze U, Wheeler H. Rationalization of microscopy in the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in women. Int J STD AIDS 2007; 18(10): 705-706.
9. Kronvall G, Myhre E. Differential staining of bacteria in clinical specimens using acridine orange buffered at low pH. Acta Pathol Microbiol Scand 1977; 85(4): 249-254.
10. 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.
11. Flores E, Albarado L, Thomas D, Lobo A. 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. Salus 2008; 12: 29-35.

12. De Abajo F. La Declaración de Helsinki VI. Rev Esp Salud Pública 2001; 75: 407-442.
13. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires 1999.
14. Germán P, Pérez M, Pacheco A, Mata M. Algunas consideraciones sobre *Neisseria gonorrhoeae*. Acta Odon Vzlana 2004; 42:11.
15. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Bailey & Scott. Diagnóstico microbiológico. Undécima edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires 2004.
16. Ison C, McLean K, Gedney J, Munday P, Coghill D, Smith R, Harris J, Easmon C. 1985. Evaluation of a direct immunofluorescence test for diagnosing gonorrhoea. *J. Clin. Pathol* 1985; 38: 1142-1145.
17. Sokal R y Rohlf F. Biometría principios y métodos estadísticos en investigación biológica. H. Blume editorial. Barcelona, 1979.
18. Burgueño M, García J, González, J. Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. Med Clin (Barc) 1995; 104:661-670.
19. Ross J, Ison C, Carder C, Lewis D, Mercey D, Young H. Sexually Transmitted Infections: UK National Screening and Testing Guidelines. Screening Guidelines Steering Committee commissioned by Clinical Effectiveness Group. 2006.
20. Marazía S, Barnabei L, De Caterina R. Receiver operating characteristic (ROC) curves and the definition of threshold levels to diagnose coronary artery disease on electrocardiographic stress testing. Part II: the use of ROC curves in the choice of electrocardiographic stress test markers of ischaemia. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2008; 9:22-31.
21. Kellogg D, Peacock W, Deacon W, Brown L, Pirkle C. *Neisseria gonorrhoeae*. I. Virulence genetically linked to colonial variation. *J. Bacteriol* 1963; 85: 1274-1279.
22. Kellogg D, Cohen I, Norims L, Schroeter A, Reising G. *Neisseria gonorrhoeae*. Colonial variation and pathogenicity during 35 months in vitro. *J Bacteriol* 1968; 96:596-605.
23. Bumgarner L, Finkelstein R. Pathogenesis and immunology of experimental gonococcal infection: virulence of colony types of *Neisseria gonorrhoeae* for chicken embryos. *Infect Immun* 1973; 8:919-924.