

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

Departamento de Bacteriología-Micología

**Laboratorio Nacional de Referencia de Neisserias
Patógenas**

**Estudio de la resistencia a los Antimicrobianos y Caracterización
Molecular en Cepas de *Neisseria gonorrhoeae* Aisladas en Cuba.**

Tesis Presentada en Opción al Grado de

Doctor en Ciencias Médicas

Autor: Dr. Jorge Sosa Puente, MD, MSc

Asesores: Dr. Herio Toledo MD, Dr.C

Dra. Alina Llop Hernández MD

Ciudad de la Habana

2002

AGRADECIMIENTOS

La dedicación a tan noble empeño, el de vigilar el comportamiento de una enfermedad infecciosa como la gonorrea, ha permitido el diseño y desarrollo de la presente investigación. Quiero agradecer a todos aquellos que me ayudaron y estimularon a hacer de ésta un tema para optar al grado de "Doctor en Ciencias Médicas".

En especial:

Dra. Jo-Anne R. Dillon, quien puso a mi disposición el total de los recursos y fue una entrañable colega; sin su contribución no hubiera sido posible realizar esta investigación.

Dra. María Margarita Ramírez, por su paciencia y ayuda incondicional, **Muchas Gracias.**

Margarita V. Dapena, siempre dispuesta, sorprendentemente exacta y profesional, magnífica colega, **Gracias** por tu oponentencia.

Dra. Llop, por su mantenido interés desde el comienzo de la presente investigación.

Delfina y Valdivia, por el apoyo y estimables consejos, por el trato sincero.

Dra. Guadalupe Guzmán y Dr. Reynel Cancio, nunca me dijeron "No".

Araceli, María del Carmen, Lidia y Lázaro, por su alegre y oportuna ayuda.

A mi hermano Victor y a todos...

¡Muchas Gracias!

DEDICATORIA

A mis Hijos y a mi Esposa,

A mis Padres

ABREVIATURAS

A/S: Auxotipo/serovar.

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima.

CMPR: Aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* con resistencia cromosomal a la penicilina.

CMRNG: Aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* con resistencia cromosomal a la penicilina y la tetraciclina.

CMTR: Aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* con resistencia cromosomal a la tetraciclina.

GASP: Programa de Vigilancia de la Susceptibilidad Gonocócica a los Antimicrobianos, OPS/OMS.

GISP: Programa de Vigilancia para aislamientos de gonococo (Estados Unidos de América).

ITS: Infección de Transmisión sexual.

LCDC: Centro de Laboratorios para el Control de Enfermedades.

LNRNP: Laboratorio Nacional de Referencia de Neisserias Patógenas.

LOS: Lipo-ologosacáridos.

NCCLS: Comité Nacional para Normas de Laboratorio Clínico.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPS: Organización Panamericana de la Salud.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PFGE: Electroforesis en gel de campo pulsado.

PP/TRNG: Aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* productores de penicilinas y con alto nivel de resistencia a la tetraciclina.

PPNG: Aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* productores de penicilinas.

QRNG: Resistencia cromosomal a las quinolonas.

ROP: Región del Oeste del Pacífico.

RSEA: Región del Sudeste de Asia.

TCG: Medio de Transporte y Conservación para Gonococos.

TMM: Medio de Thayer Martin Modificado.

TRNG: Aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* con alto nivel de resistencia a la tetraciclina.

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

SÍNTESIS

Por primera vez se estudiaron 91 cepas aisladas del tracto genitourinario de pacientes de 11 provincias de Cuba. Sesenta y dos aislamientos (68%) mostraron resistencia a la penicilina (CIM ≥ 2 mg/L), 27 (29,7 %) susceptibilidad intermedia (CIM 0,12-1 mg/L) y 2 (2,2 %) fueron susceptibles (CIM $\leq 0,06$ mg/L). El 83,5% de las cepas estudiadas resultaron resistentes (CIM ≥ 2 mg/L) a la tetraciclina y ninguna susceptible (CIM $\leq 0,25$ mg/L). Una parte importante de los aislamientos estudiados fueron productores de penicilinasa (PPNG) (56%) y mostraron altos niveles de resistencia a la tetraciclina (TRNG) (63,7%). Se identificaron 5 cepas resistentes a la azitromicina y 49 con susceptibilidad intermedia. No se encontraron cepas con resistencia ni susceptibilidad intermedia a la ciprofloxacina, espectinomicina ni ceftriaxona. Seis perfiles plasmídicos se identificaron, el más frecuente fue el de 2,6-3,2-25,2 MDa. Predominó el determinante *tet-M* tipo Americano y las clases de auxotipos/serovares más frecuentes resultaron ser la proto/IA-6, P-/IA-6 y proto/IB-1. La estructura de población de las cepas estudiadas estuvo compuesta por cuatro fenotipos principales, mientras que aislamientos procedentes de las tres regiones del país, aisladas en los años 1995,1996 y 1997, contribuyeron a la incidencia dentro del cluster I mayor identificado por el análisis de los patrones de macrorrestricción en electroforesis en gel de campo pulsado. Cepas de gonococo relacionadas con aislamientos del "cluster" I (17 aislamientos) deben constituir el grupo principal de transmisión de la enfermedad y diseminación de la resistencia en nuestro país.

CONTENIDO

Capítulo I- INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. HIPÓTESIS	5
I.2. OBJETIVOS	5
I.3. NOVEDAD CIENTÍFICA	5
I.4. VALOR TEÓRICO	6
I.5. VALOR PRÁCTICO	6
Título II- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
II.1. RECUENTO HISTÓRICO DE LA ENFERMEDAD GONOCÓCCICA	7
II.2. PANORAMA MUNDIAL DE LA INCIDENCIA Y PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD GONOCÓCCICA.....	8
II.2.1. Países desarrollados.....	10
II.2.2. Países en desarrollo	11
II.2.2.1 En Cuba	12
II.3. TAXONOMÍA	13
II.4. ALGUNAS CARACTERÍSTICAS RELEVANTES DEL GONOCOCO	13
II.5. PATOGENIA. ESTRUCTURAS DE SUPERFICIE DEL GONOCOCO	15
II.5.1. Pelos	16
II.5.2. Proteínas de membrana externa (OMPs)	16
II.5.3. Lipooligosacáridos	18
II.5.4. Proteasa IgA	18
II.5.5. H.8 y Azurina modificada por lípidos (Laz)	19
II.6. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD GONOCÓCCICA.....	19
II.6.1. Diagnóstico clínico.....	19
II.6.2. Diagnóstico de laboratorio.....	21
II.7. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS EN <i>N. GONORRHOEAE</i>	27
II.7.1. Penicilinas:	29
II.7.2. Cefalosporinas.....	30
II.7.3. Espectinomomicina y aminoglucósidos.....	30
II.7.4. Quinolonas.....	31
II.7.5. Tetraciclinas:.....	31
II.7.6. Combinación Sulfonamida-Trimetoprima	32
II.7.7. Nuevos macrólidos.....	32
II.8. EPIDEMIOLOGÍA DE LA DISEMINACIÓN DE LA RESISTENCIA EN <i>N. GONORRHOEAE</i>	33
Capítulo III- MATERIALES Y METODOS	37
III.1. CEPAS BACTERIANAS	37
III.2. IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS	37
III.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD B-LACTAMASA	38
III.4. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA	38
III.5. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO.....	40
III.6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA DEL DETERMINANTE <i>TET-M</i>	42
III.7. DETERMINACIÓN DEL AUXOTIPO	43
III.8. CLASIFICACIÓN SEROLÓGICA (SEROGRUPOS Y SEROVARES)	46
III.9. ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)	48

III.9.1. Preparación del ADN cromosomal y digestión con endonucleasas de restricción.....	48
III.9.2. Electroforesis y visualización del ADN.....	49
III.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	50
Capítulo IV- RESULTADOS	51
IV.1. DISTRIBUCIÓN DE AISLAMIENTOS DE <i>N. GONORRHOEAE</i> POR PROVINCIAS Y AÑOS.	51
IV.2. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.	51
IV.3. PERFIL PLASMÍDICO.....	52
IV.4. DETERMINANTE <i>TET-M</i> Y PERFIL PLASMÍDICO.....	53
IV.5. AUXOTIPOS	53
IV.6. SEROGRUPO Y SEROVARES.....	53
IV.7. AUXOTIPOS, SEROVARES.....	54
IV.8. ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPO PULSADO	55
IV.9. TABLAS.....	56
IV.10. FIGURAS.....	66
Capítulo V- DISCUSIÓN	68
V.1. SUSCEPTIBILIDAD A LA PENICILINA.....	69
V.2. SUSCEPTIBILIDAD A LA TETRACICLINA	71
V.3. SUSCEPTIBILIDAD A LA AZITROMICINA	74
V.4. SUSCEPTIBILIDAD A LA CIPROFLOXACINA.....	76
V.5. SUSCEPTIBILIDAD A LA ESPECTINOMICINA.....	78
V.6. SUSCEPTIBILIDAD A LA CEFTRIAXONA	79
V.7. ANÁLISIS DEL PERFIL PLASMÍDICO.....	80
V.8. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR	84
Capítulo VI- CONCLUSIONES	90
Capítulo VII- Recomendaciones	91
Capítulo VIII- BIBLIOGRAFÍA.....	92
Capítulo IX- Bibliografía del autor.....	119
IX.1. RELACIONADAS CON LA INVESTIGACIÓN.....	119
IX.2. NO RELACIONADAS CON LA INVESTIGACIÓN	116
IX.3 PRESENTACIÓN EN EVENTOS	117
Capítulo X- Anexo	119

CAPÍTULO I- INTRODUCCIÓN

Neisseria gonorrhoeae, comúnmente llamado gonococo, es el agente etiológico de la gonorrea, una enfermedad que ocurre solamente en humanos. Este microorganismo infecta el epitelio de las superficies mucosas expuestas de uretra y endocervix, y con menor frecuencia el recto y la orofaringe (Handsfield, 1990).

La gonorrea es una infección de transmisión sexual (ITS), una de las enfermedades infecciosas más difundidas y una causa de morbilidad aguda y crónica en todo el mundo, aconteciendo en un estimado de 60 millones de casos nuevos cada año (Ison *et al*, 1998; Viscidi *et al*, 2000). Los datos suministrados por la OMS son un subregistro de la incidencia real de esta enfermedad en el mundo, debido a que algunos países no informan a dicha organización y otros cuentan con sistemas de salud que no pueden estimar correctamente la frecuencia de la enfermedad (Barnes y Holmes, 1984).

El no tratamiento de esta infección, o el fracaso terapéutico provoca consecuencias perjudiciales para el enfermo y la comunidad. En la mujer, muchas veces la infección cursa de forma asintomática. Se conoce que el riesgo de infertilidad tubaria tras un episodio inicial de enfermedad pélvica aguda es de un 4%, éste aumenta a un 33% y a más del 60% después de una segunda y tercera repetición de la infección, respectivamente; el 6% de los embarazos en mujeres con antecedentes de inflamación pélvica son ectópicos, los que pueden causar hasta la muerte. La infección por *N. gonorrhoeae* es causa frecuente de infección post-parto y post-aborto y, en los recién nacidos puede producir conjuntivitis con graves secuelas. La gonorrea, en los pacientes tanto masculinos como femeninos, condiciona la diseminación del VIH al incrementar la carga viral en el semen o en fluidos cervicovaginales y facilitar la penetración de la barrera mucosa por el virus (Cohen *et al*, 1997; Ghys *et al*, 1997; Cohen 1998; Levine *et al*, 1998).

La enfermedad gonocócica no curada puede así mismo, afectar la fertilidad masculina. Otra de las complicaciones de la gonorrea es la diseminación del agente a otros órganos del cuerpo como son la piel, el corazón y las meninges. De igual manera, si no se logra la curación del enfermo se causan daños a la comunidad, ya que aumenta el período de la transmisibilidad de la infección, se genera un incremento en el número de consultas médicas, del consumo de antimicrobianos y, por tanto, de la posibilidad de selección de microorganismos resistentes. Por sólo mencionar un

país, Estados Unidos de Norteamérica, en un año, la enfermedad pélvica aguda por *N. gonorrhoeae* costó 300 millones de dólares, pero con el costo de las secuelas, esta cifra asciende a 1.25 billones de dólares (Westrom y Mardh, 1983; Barnes y Holmes, 1984; Robertson, 1984; Benenson, 1992; Center for Disease Control, 1993).

El desarrollo y uso de los antimicrobianos han sido de los objetivos más importantes planteados para el control de las enfermedades bacterianas en el siglo XX; su introducción a mediados de la década del treinta abrió las puertas a una era en la que las enfermedades no infecciosas comenzaron a superar en frecuencia a las infecciones, en las estadísticas de la morbilidad. En la década de los años sesenta, estudiosos del tema llegaron a plantear incluso que la victoria sobre las enfermedades infecciosas era inminente. Desgraciadamente, ahora, al comienzo del siglo XXI a la introducción de cada nueva droga le sigue la emergencia de microorganismos con nuevos mecanismos de resistencia bacteriana. Esto ha hecho que los encargados de enfrentar el tratamiento de las infecciones cuenten con un arsenal cada vez más pequeño de fármacos eficaces. La consecuencia directa de este fenómeno es la aparición de cepas multirresistentes que ponen en peligro el control de enfermedades como la tuberculosis, o que surjan gérmenes como el estafilococo que responden solamente a la vancomicina, y enterococos resistentes a todo tipo de antimicrobianos conocidos. La solución de este problema involucra muchas esferas de la medicina, donde la vigilancia microbiológica y el control en la administración de antimicrobianos aportarán mejores resultados que el diseño y producción de nuevos medicamentos (Murray, 1994; Armelagos, 1998).

N. gonorrhoeae no escapa del grupo de infecciones adquiridas en la comunidad que han desarrollado cambios en la susceptibilidad frente a los antimicrobianos, lo cual ha ocasionado numerosas variaciones en los esquemas de tratamiento recomendados.

El origen genético de la resistencia antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* se debe a mutaciones en el cromosoma y a la adquisición de plasmidios que portan genes de resistencia a los antimicrobianos. La resistencia de tipo cromosómica apareció en los años cincuenta y se han descrito dos clases: la primera es específica a una sola droga, debido a una sola mutación y el nivel de la resistencia es alto; la segunda involucra mutaciones en varios locus del cromosoma, la combinación de estas mutaciones determina tanto el nivel como el patrón de la resistencia (Lind, 1997).

El fenómeno de la resistencia plasmídica está ampliamente difundido en todo el mundo, alcanzando niveles de endemia en muchas regiones; las cepas con estos altos niveles de resistencia confieren, además, el peligro de la transmisión horizontal de esta característica biológica (Dillon y Yeung, 1989). Así se evidencia que *N. gonorrhoeae* ha demostrado una gran adaptación a la presión evolutiva impuesta por la farmacoterapia en los últimos 50 años.

Para conocer a profundidad el comportamiento de la enfermedad gonocócica se recomienda adoptar un punto de vista multidisciplinario. La gonorrea se distribuye desigualmente en la población y los factores sociales determinan la persona que será infectada, por lo tanto los estudios epidemiológicos relacionados con el control y con el impacto de la adaptación del gonococo a las condiciones de su ambiente (resistencia antimicrobiana), tienen su base en la participación necesaria de los microbiólogos de la salud pública, especialmente aquellos que desarrollan la caracterización de los aislamientos en el “Laboratorio Nacional de Referencia” mediante las técnicas más novedosas de laboratorio (Barnes y Holmes, 1984).

Los principales métodos contemporáneos usados para la caracterización de cepas de *N. gonorrhoeae* incluyen, además de los estudios del perfil de susceptibilidad antimicrobiana y plasmídico, la determinación del auxotipo, el serovar y aquellos que permiten conocer el tipo genético de poblaciones bacterianas, como la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (Knapp *et al.*, 1987 a; Knapp *et al.*, 1987 b; Xia *et al.*, 1995).

Estos sistemas de tipificación permiten distinguir entre poblaciones de gonococo diferentes y seguir la huella de fenotipos o subtipos individuales durante su diseminación, además, constituyen un potencial para estudios detallados de la microepidemiología de la gonorrea en la comunidad (O’Rourke y Stevens, 1993).

La dinámica de transmisión de la gonorrea puede estar asociada con factores independientes y dependientes del microorganismo (el gonococo), pudiendo mencionarse en este último caso la virulencia, la infectividad y la capacidad intrínseca para colonizar, persistir e infectar la superficie de la mucosa del huésped. De la misma forma, subtipos particulares de gonococo pueden asociarse a pacientes con determinada característica social o geográfica (Morse *et al.*, 1982) y tales asociaciones pueden influir en la prevalencia de patrones de susceptibilidad antimicrobiana. De todo esto se puede inferir que la resistencia antimicrobiana es una prioridad subordinada a otros

factores determinantes en la transmisión y sobre vivencia del gonococo (Rowbotham *et al*, 1994).

En Cuba ha ocurrido un incremento en la notificación del número de casos de gonorrea, ascendiendo de 130 en el año 1960 y a más de 45 000 en 1995 (Ministerio de Salud Pública, 1997a). A pesar de estos reportes, en nuestro país no se cuenta hasta el momento con un sistema de vigilancia continuo de las cepas que circulan. El Programa Nacional de Control de la Gonorrea recomienda el examen de las secreciones del aparato genitourinario mediante la coloración de Gram como único método de diagnóstico, debido a que por problemas económicos no se puede asumir el costo del cultivo e identificación de *N. gonorrhoeae* en la red de laboratorios de las unidades de atención del nivel primario y secundario. Estos elementos han determinado también el escaso e irregular envío de cepas desde los laboratorios de la red al Laboratorio Nacional de Referencia de Neisserias Patógenas del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Por otra parte, el "Programa de Control de la gonorrea" considera a la penicilina y la tetraciclina, desde hace casi más de 30 años, como la primera y segunda droga de elección en el tratamiento de la enfermedad gonocócica (Ministerio de Salud Pública, 1997b).

No es por accidente que surjan aislamientos de *N. gonorrhoeae* resistentes a los antimicrobianos en áreas donde el uso y la susceptibilidad a las drogas empleadas en el tratamiento de la enfermedad gonocócica no son supervisados y controlados. Así surgió la resistencia cromosomal y mediada por plasmidios a la penicilina y la tetraciclina, que se diseminó desde regiones como el Sureste de Asia y África (Willcox, 1970; Ashford, 1976; West *et al*, 1995), lo que hoy día sigue sucediendo en muchas regiones y es una consecuencia del mal uso de estos antibióticos poco costosos y de gran disponibilidad en todo el mundo. De manera similar, ha ocurrido la resistencia a la espectinomicina, la que ha desaparecido virtualmente después que se dejó de usar como droga de primera línea en el tratamiento de la enfermedad gonocócica, y más recientemente ha emergido y se ha diseminado la resistencia a las quinolonas desde estos mismos focos (WHO Western Pacific region, GASP, 1997).

En el presente estudio nos proponemos analizar el comportamiento de la susceptibilidad antimicrobiana y del perfil plasmídico de un grupo de cepas aisladas en 11 provincias de Cuba y señalar algunos elementos que han influido en la evolución de la resistencia antimicrobiana del gonococo, así como establecer la relación e incidencia de dichos aislamientos según las clases individuales de A/S encontradas y su comportamiento genético.

I.1. HIPÓTESIS

En Cuba, los aislamientos de *N. gonorrhoeae* con alto nivel de resistencia plasmídica a la penicilina y la tetraciclina son endémicos y más frecuentes que aquellos con resistencia cromosomal a estas drogas.

I.2. OBJETIVOS

General:

Contribuir a la vigilancia de la resistencia antimicrobiana de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* realizados en Cuba, mediante el empleo de los marcadores epidemiológicos contemporáneos utilizados en su caracterización.

Específicos:

1. Estudiar el comportamiento de la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *N. gonorrhoeae* aisladas de pacientes en Cuba.
2. Conocer el perfil plasmídico de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* obtenidos e identificar el tipo de determinante *tet-M* de los plasmidios de 25,2 MDa de dichos aislamientos.
3. Estudiar la distribución de auxotipos y serovares de las cepas de *N. gonorrhoeae* estudiadas.
4. Identificar “clusters” entre las clases mayores de A/S mediante el análisis de los patrones de Electroforesis en Gel de Campo Pulsado obtenidos con el empleo de las enzimas de restricción *NbeI* y *SpeI*.

I.3. NOVEDAD CIENTÍFICA

Datos confiables de susceptibilidad antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* no son fáciles de obtener sobre todo en países subdesarrollados. Sin embargo, aquellos que están disponibles sugieren que el gonococo continúa desarrollando resistencia a los agentes antimicrobianos de menor costo y mayor disponibilidad, y también a los más recientemente introducidos en el tratamiento de la gonorrea. La **novedad científica** de esta investigación consiste en que por primera vez en nuestro medio se realiza un estudio epidemiológico-molecular del comportamiento de la resistencia antimicrobiana en cepas de *N. gonorrhoeae* procedentes de **11 provincias de Cuba**, mediante el empleo de los métodos de caracterización fenotípicos y genotípicos

contemporáneos. Se establece un punto de referencia para el seguimiento de la diseminación y/o emergencia de tipos y subtipos de aislamientos de gonococo que exhiben resistencia a los antimicrobianos recomendados actualmente por la OMS en el tratamiento de la enfermedad gonocócica.

1.4. VALOR TEÓRICO

El presente estudio permite conocer la estructura básica fenotípica en una población de cepas de *N. gonorrhoeae* procedentes de 11 provincias de Cuba e identifica los determinantes genéticos responsables del alto nivel de resistencia a la penicilina y la tetraciclina. Igualmente permite suponer cual es el grupo principal de la transmisión de la enfermedad y diseminación de la resistencia en nuestro medio.

I.5. VALOR PRÁCTICO

Esta investigación se consolida a raíz de la incorporación del Laboratorio Nacional de Referencia de Neisserias Patógenas, Instituto “Pedro Kouri”, de Cuba al **Programa de Vigilancia de la Susceptibilidad Gonocócica a los Antimicrobianos (GASP) en las Américas y el Caribe.** La mayor parte del estudio fue desarrollado en el Laboratorio de *N. gonorrhoeae* (Centro Coordinador de la Organización Mundial de la Salud / Organización Panamericana de la Salud - Universidad de Ottawa, Canadá), lo que permitió el entrenamiento y capacitación de un profesional en el diagnóstico, así como en el aseguramiento y control de la calidad de los métodos necesarios en la vigilancia de la susceptibilidad antimicrobiana. Los resultados obtenidos en este trabajo forman parte del reporte nacional y regional de la resistencia antimicrobiana de *N. gonorrhoeae*, lo que contribuye al análisis y establecimiento de nuevas pautas de tratamiento de la gonorrea en Cuba. La introducción y el empleo de los marcadores epidemiológicos contemporáneos permiten un monitoreo y vigilancia integral de la susceptibilidad antimicrobiana en nuestro medio. Los resultados incluidos en esta tesis se presentaron en seis eventos científicos internacionales y se han publicado en tres revistas indexadas internacionalmente y en un libro (OPS). Además, contribuyeron a tres logros institucionales de la ciencia.

TÍTULO II- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. Recuento histórico de la enfermedad gonocócica

El origen venéreo de la gonorrea, enfermedad humana causada por *N. gonorrhoeae*, también llamado gonococo, fue conocido desde la antigüedad. Se hace referencia a ella en el Viejo Testamento de la Biblia, Levítico capítulo 15, así como en escritos primitivos chinos y egipcios (Hook y Handsfield, 1990).

La descarga uretral característica de esta enfermedad fue descrita por el emperador chino Huan-Ti en el año 2 367 a. E.C. Ésta también fue descrita por Hipócrates (400 a.E.C.), y el famoso médico griego Claudio Galeno (130 d.E.C) introdujo su nombre. El término gonorrea deriva del griego gonos (semilla) y rhein (fluir) y se llama así por la semejanza que guarda la descarga uretral purulenta, característica de la infección, con la eyaculación del semen. La enfermedad tiene una serie de denominaciones populares tales como “clap”, “gota militar”, “semilla”, y “gota de la mañana”. El término clap proviene del francés clapoir (burdel), ya que al principio la infección se relacionaba con prostitutas (Guthe, 1971; Hook y Holmes, 1985).

En el año 1 500 se creía que la sífilis y la gonorrea eran una misma enfermedad (Guthe, 1971). En este sentido, Paracelso, un maestro de gran influencia en el siglo XVI pensaba que la gonorrea era un síntoma precoz de la sífilis. Así, para distinguir entre ambos procesos el célebre médico inglés John Hunter se inoculó exudado purulento procedente de un enfermo con la enfermedad gonocócica, pero lamentablemente el donante padecía ambas infecciones (Mendiola, 1989). Hubo que esperar hasta la mitad del siglo XIX para diferenciar claramente estas enfermedades, cuando en 1830, Ricard demostró de forma categórica la diferencia (Mendiola, 1989).

La naturaleza infecto-contagiosa de esta enfermedad se estableció en 1876 en Inglaterra por John de Ardene, quién describió la uretritis contagiosa (Laga, 1994). El único hospedero natural de *N. gonorrhoeae* es el hombre y se transmite de persona a persona. (Lind, 1986).

Albert Neisser, en 1879, describe el germen por vez primera al observar en los exudados rectales de adultos y en las secreciones oculares de niños con conjuntivitis purulenta, la presencia de diplococos arriñonados gramnegativos intracelulares (Dans, 1975). Neisser en

1879 encontró el agente etiológico de la gonorrea en exudados coloreados y en 1881, Listikov y Loeffler lograron cultivar este microorganismo. Bumom, en 1885 con un estudio detallado consideró al gonococo como el agente causal de la gonorrea (Kaye, 1985; Handsfield, 1990; Evangelista y Beilstein, 1993).

En 1911 y en 1919, Leiz y Browson reportaron la localización faríngea de la infección, respectivamente (Reyn, 1977) y en 1964 Thayer y Martin proponen un nuevo medio para el cultivo de *N. gonorrhoeae*, el cual ellos modificaron en 1966, dando mejores y mayores posibilidades para su aislamiento (Henderson, 1975).

II.2. Panorama mundial de la incidencia y prevalencia de la enfermedad gonocócica

Los datos sobre la incidencia de la gonorrea son a menudo difíciles de obtener, debido a que algunos países no hacen informes a la OMS y no cuentan con un sistema de salud que pueda estimar correctamente la frecuencia de la enfermedad. Además, la validez de estos informes esta comprometida por: 1) la falta de un criterio diagnóstico uniforme, 2) la dificultad del diagnóstico clínico en las mujeres, y 3) la dificultad para identificar la enfermedad gonocócica invasiva (Barnes y Holmes, 1984). Recientes estimados globales hechos por la OMS sugirieron que de los aproximadamente 62 millones de casos de enfermedad gonocócica, adquirida en el año 1995, la mayoría ocurrió en el Sur y Sudeste de Asia, en la región sub-Sahariana de África y América Central y del Sur. De lo que se puede decir que los países subdesarrollados exhiben tasas más altas de la enfermedad que los países desarrollados (Gerbase *et al.*, 1998).

Para hombres, el estimado de prevalencia de la gonorrea (en adultos con edad entre 15 y 49 años) en el año 1995 fue del 2% en África sub-Sahariana, 1% en el Sur y Sudeste de Asia y 0,6% en América Latina y el Caribe. Las tasas, por ejemplo, en el Oeste de Europa (0,07%), y 0,1% en el Norte de América y Australia constituyeron una décima parte de aquella estimada en países desarrollados (Gerbase *et al.*, 1998).

Las tasas de prevalencia para mujeres fueron aún más altas que en hombres alcanzando el 2% en el África sub-Sahariana, 1,4% en el Sur y Sudeste de Asia y 1,1% en América Latina y el Caribe. Una vez más, por la vía de la comparación, las naciones desarrolladas tuvieron más baja proporción de la población femenina infectada; 0,2% en el Oeste de Europa y 0,4 % en Norte América, Australia y Asia respectivamente. A pesar de que estos mismos autores reconocen las

deficiencias de estos datos, en cuanto a la calidad como la cantidad, hicieron estimados de la incidencia para ese año 1995. Las tasas más altas por 1 000 habitantes de la población con edad entre 15 y 49 años fueron señaladas en África sub-Sahariana (hombres 57,71, mujeres 65,47), Sur y Sudeste de Asia (hombres 30,03 y mujeres 31,8), y América Latina y el Caribe (hombres 27,56 y mujeres 29,23). Las tasas más bajas estuvieron en el Este de Asia y el Pacífico (hombres 4,35 y mujeres 3,79), Oeste de Europa (hombres 5,59 y mujeres 6,01), y Norte América, Australia y Asia (para ambos hombres 10,85 y mujeres 12,04) (Gerbase *et al.*, 1998).

Este panorama (62 millones de casos en 1995) fue de una magnitud significativamente mayor que en 1990 cuando el estimado de la OMS estuvo alrededor de los 25 millones de nuevos casos de gonorrea. Es importante, sin embargo, tener en cuenta que en cada estudio existieron diferencias metodológicas significativas. Es perceptible la inseguridad sobre los datos actualmente disponibles y la importancia que tiene en ello la colección de los datos de incidencia y prevalencia (Tapsall, 2001). Finalmente, el número de nuevos casos esperados de la enfermedad gonocócica para 1999 fue similar al estimado en 1995 como se ilustra a continuación (Anónimo, 2001):

Tabla 1. Estimado de nuevos casos de gonorrea (en millón) en adultos, 1995 y 1999.

Región	1995			1999		
	Mujeres	Hombres	Total	Mujeres	Hombres	Total
América del Norte	0.92	0.83	1.75	0.84	0.72	1.56
Oeste de Europa	0.63	0.60	1.23	0.63	0.49	1.11
África del Norte y Oriente Medio	0.77	0.77	1.54	0.68	0.79	1.47
Este de Europa – Asia Central	1.16	1.17	2.32	1.81	1.50	3.31
África Subsahariana	8.38	7.30	15.67	8.84	8.19	17.03
Sur y Sudeste de Asia	14.55	14.56	29.11	15.09	12.12	27.20
Este de Asia y Pacífico	1.47	1.80	3.27	1.68	1.59	3.27
Australia y Nueva Zelanda	0.07	0.06	0.13	0.06	0.06	0.12
América Latina y el Caribe	3.67	3.045	7.12	4.01	3.26	7.27
Total	31.66	30.54	62.15	33.65	28.70	62.35

La incidencia de la gonorrea, al igual que de otras enfermedades de transmisión sexual, es afectada por la influencia de otros factores incluyendo patrones de conducta sexual, población demográfica y condiciones económicas y sociales (Piot y Islam, 1994). La influencia de algunos de estos factores constituyen un punto de continuas reflexiones y, es además de una gran relevancia en la comprensión del papel de la terapia antimicrobiana apropiada y el control de la enfermedad gonocócica (Anónimo, 1999b).

II.2.1. Países desarrollados

Entre los países industrializados del Oeste se observó un incremento de la incidencia de la enfermedad gonocócica durante la Segunda Guerra Mundial, después le siguió una disminución de los casos en los años cincuenta y entonces otro incremento hasta los setenta cuando ocurrió otro descenso. Una continua disminución de las tasas de gonorrea en Suecia y algunos otros países de Europa en la década de los ochenta y primeros años de los noventa llevó a la desaparición virtual de la enfermedad endémica (Kohl, 1994; Tapsall, 2001). Por ejemplo en Suecia la tasa de incidencia en 1970 fue de 487 casos por 100,000 habitantes, pero declinó desde los setenta a través de los ochenta hasta alcanzar menos de 5 por 100,000 habitantes en 1992. Esta disminución fue atribuida a un programa sostenido combinado de información y educación con un uso extendido de facilidades diagnósticas para reconocer las infecciones asintomáticas y sintomáticas, acoplado a un tratamiento efectivo (Kihlstrom y Danielsson, 1994).

En algunos países industrializados del Oeste de Europa la disminución fue menos marcada hasta la aparición del virus de la VIH y el SIDA. La publicidad relacionada con la transmisión sexual del VIH y el cambio del comportamiento que acompañó a este incremento de la conciencia resultó en tasas de gonorrea sustancialmente disminuidas en el Oeste de Europa, Australia, y los Estados Unidos de América en los ochenta y principios de los noventa (Weller *et al.*, 1984; Carne *et al.*, 1987; Australian gonococcal surveillance programme, 1988; van de Laar *et al.*, 1990; van de Laar *et al.*, 1997; Kyriakis *et al.*, 1999).

Al final de la década de los noventa existían evidencias de que la incidencia de la enfermedad se incrementaba de nuevo en algunos sectores de estas comunidades. En los Estados Unidos aunque las tasas de la enfermedad gonocócica continúan disminuyendo desde el total de los

casos, la incidencia en hombres homosexualmente activos parece estar aumentando en algunas ciudades (Whittington *et al.*, 1997; Fox *et al.*, 1998; Handsfield *et al.*, 1999; Page-Shafer *et al.*, 1999). En Europa y Australia, hallazgos similares han sido reportados (van den Hoek *et al.*, 1990; Australian gonococcal surveillance programme, 1999).

Las dificultades relacionadas con una vigilancia confiable en Europa del Este y Asia Central han sido citadas recientemente (Waugh, 1999). En esta región ha habido una marcada disminución de la búsqueda masiva y seguimiento de contactos, por lo que los datos reportados subestiman hoy día la verdadera magnitud de la epidemia. Adicionalmente, y especialmente para la gonorrea, los pacientes no son atendidos en clínicas del estado y son tratados por ellos mismos o practicantes privados de la medicina. Se piensa que solamente un 5% de los casos de gonorrea son ahora reportados y que aún este bajo nivel de reporte se agudizará adicionalmente (Tapsall, 2001).

II.2.2. Países en desarrollo

El cuadro está lejos de la realidad y menos claro en los países en desarrollo. Es aceptado que las tasas de la enfermedad gonocócica son mucho más altas que en todos los países desarrollados y que tasas dispares son reportadas desde diferentes países y subgrupos (Piot y Islam, 1994; Gerbase *et al.*, 1998). Con relación al control de las infecciones de transmisión sexual la situación en los países subdesarrollados ha sido comparada con la de los países desarrollados a principios del siglo XX (Catchpole, 1996). Estimados de prevalencia incluyen tasas de entre 10 al 12% en consultas de planificación familiar y clínicas pre-natales (Pham-Kanter *et al.*, 1996) y 14,3% en trabajadores del sexo femenino (Ramjee *et al.*, 1998) en Suráfrica. En Malawi la infección cervical con *N. gonorrhoeae* fue encontrada en un 5% de la población femenina urbana pre-parto, comparable a la tasa de infecciones en poblaciones de bajo riesgo en otros países de la región (Daly *et al.*, 1997).

El efecto de cambio del comportamiento debido a la publicidad dada a la transmisión sexual del VIH ha sido menos marcada que en los países desarrollados. Sin embargo, el programa de control de Tailandia el cual logró una reducción en la tasa de transmisión del VIH, también consiguió una reducción del número de casos de gonorrea notificados en más de un 80% en el mismo período desde 1987 a 1993 (Hananberg *et al.* 1994). Gerbase *et al.* (1998), también

citaron ejemplos de una disminución regular en las tasas de ITS en Costa Rica, Chile y Zimbabwe, pero notaron que otros países habían reportado un incremento del número de casos desde 1990. Ellos advirtieron que estos datos podían ser el reflejo de cambios en la calidad de la vigilancia o del acceso al cuidado de salud. En un estudio longitudinal de 6 años hasta 1994 en cuatro países de América Latina, las tasas de gonorrea declinaron en tres de ellos (México, Argentina y Brasil), pero incrementaron en Venezuela (García *et al* 1995).

En China, la adquisición de datos sobre tasas de gonorrea fue abandonada debido a la pobre vigilancia en el momento que la enfermedad re-emergió con mayor fuerza en la década del ochenta. Parte del incremento de las tasas de incidencia cruda fue debido a la mejor vigilancia y el mejoramiento de las técnicas de diagnóstico (Kim, 1993). Las tasas en las regiones del sur fueron más altas que en otras partes del país e incrementaron sustancialmente hasta 1989 (Kim, 1993). Estimados de la tasa de prevalencia en toda China fueron aún menor del 1% en 1998 (Anónimo, 1998a).

En Mongolia el número de casos aumentó desde 51 hasta 142 por 100 000 habitantes en el período de 1983 a 1995, después de 1990 hubo una disminución importante en la vigilancia activa lo que explica los estimados mínimos observados (Puredawa *et al.*, 1997). Datos recientes de prevalencia en Indonesia están basados en casos confirmados en el laboratorio usando técnicas moleculares (Matulesy *et al.*, 1999) encontrando una tasa de gonorrea del 15% en trabajadores del sexo de Yakarta, Surabaya y Manado.

II.2.2.1 En Cuba

El número de casos notificados de blenorragia en Cuba tuvo un comportamiento ascendente desde el año 1965 (697 casos) hasta 1989 (40 129 casos). Sin embargo, a través de la primera mitad de los años noventa las tasas de incidencia fluctuaron de forma irregular. A partir de 1995 (45 200 casos) se observó un descenso continuo en el número de casos (19 082 casos en el año 2000), para una reducción del 57,8% (John, 1978; Anónimo, 1999 c). Los grupos de edades más afectados se han correspondido siempre con los más jóvenes en plena capacidad reproductiva, es decir, de 15 a 35 años. Una apreciación exacta de la proporción de casos según el sexo pudiera estar comprometida con el hecho de que en un porcentaje desconocido (la mayoría), de estos casos se realiza el diagnóstico mediante el método de coloración de

Gram de las secreciones obtenidas de uretra y endocervix, el cual tiene una sensibilidad muy baja en la mujer (John, 1978; Anónimo, 1999 c).

II.3. Taxonomía

Atendiendo a la novena edición del Manual Bergey de Bacteriología Sistemática, *N. gonorrhoeae* presenta la siguiente ubicación taxonómica (Bovre, 1984).

División I	Protofita
Clase II	Schizomicetae
Orden	Eubacteriales
Familia	<i>Neisseriaceae</i>
Genero	<i>Neisseria</i>
Especie	(incluye 13 especies y biovariedades)
<i>Especies patógenas</i>	<ul style="list-style-type: none">• <i>Neisseria gonorrhoeae</i>• <i>Neisseria meningitidis</i>

II.4. Algunas características relevantes del gonococo

La biología del gonococo constituye un tema fascinante. *N. gonorrhoeae* es un diplococo gramnegativo, éste ha sido aislado solamente en el humano, transmitiéndose de persona a persona fundamentalmente por contacto sexual. Este microorganismo sobrevive pobremente fuera de su ambiente natural en el hombre y tiene requerimientos nutritivos y ambientales muy complejos. Su metabolismo es aerobio y alcanza su crecimiento óptimo en 18 a 24 horas de incubación en medios enriquecidos con sangre, proteínas animales y/o suplementos bien definidos que contienen aminoácidos, azúcares y vitaminas, a una atmósfera de 5-10% de CO₂, con temperaturas entre 35 - 37°C y un pH entre 7,2 - 7,6 (Evangelista y Beilstein, 1993; Knapp y Rice, 1995). Es muy sensible a los cambios de temperatura, pH y humedad, siendo inhibido también por algunos componentes tóxicos del medio como ácidos grasos y sales. Para lograr su aislamiento, a partir de especímenes con flora mixta, se adicionan al medio de cultivo compuestos inhibidores de la misma (Brooks, 1985; Wodfar, 1988).

El gonococo es un patógeno efectivo, y como tal es capaz de evadir las defensas del huésped, así persiste dentro de éste y se transmite e infecta a otros susceptibles; de esta manera se perpetúa a sí mismo pero sin llegar, en muchas ocasiones, a causar daño severo. Un ejemplo de esta adaptación y persistencia es la capacidad de producir escasa sintomatología o enfermedad totalmente asintomática especialmente en mujeres, donde puede persistir y diseminarse sobre largos períodos. El huésped, al mismo tiempo intenta eliminar a este patógeno a través de un sistema de co-evolución “ patógeno - huésped”, un proceso Darwiniano que involucra a ambos, la generación de diversidad genética en el patógeno y la selección de la respuesta inmunológica al nivel molecular en el huésped (Brunham *et al.*, 1993).

Una de las principales características del gonococo es su alta variabilidad genotípica y fenotípica, medio a través del cual trata de evadir la respuesta inmune del huésped (Nassif y So, 1995). La variabilidad fenotípica ocurre por la expresión diferente en numerosos sitios del genoma bacteriano, mientras que la heterogeneidad y comportamiento variable del genotipo son logrados por la incorporación de nuevo material genético en dicho genoma (Nassif y So, 1995). El nuevo material genético es adquirido mediante dos procesos: la conjugación y la transformación (Rein, 1991; O'Rourke y Stevens, 1993).

Un resultado de la adaptación evolutiva del gonococo al tracto genital es el desarrollo de requerimientos especiales para su crecimiento “in vitro”, por ejemplo para el CO₂, para sulfuros en forma de cisteína y para el hierro. El gonococo tiene requerimientos múltiples y adicionales en el crecimiento “ in vitro”, lo cual explica las dificultades experimentadas en la formulación de medios de cultivos y en la obtención de óptimas condiciones para su crecimiento. Además, afecta la capacidad diagnóstica y empleo o desarrollo de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en el marco de los métodos tradicionales y accesibles de laboratorio (Anónimo, 1999 b). Finalmente, la definición de estos criterios contribuyó a idear los medios de auxotipos para la diferenciación de gonococos (Catlin, 1973).

El gonococo tiene una típica pared celular de bacterias gramnegativas. Muchos de los componentes de esta pared celular han sido intensamente estudiados y el conocimiento adquirido sobre estas investigaciones ha ayudado a explicar aspectos de la interacción huésped / parásito. La adhesión del microorganismo a la superficie epitelial, su capacidad de atravesar el

epitelio y su reacción con los fagocitos están todos bajo la influencia de la estructura de la pared celular incluyendo los pelos, proteínas de membrana externa y LOS.

II.5. Patogenia. Estructuras de superficie del gonococo

El gonococo es un patógeno con gran capacidad de adaptación al desarrollar con determinada facilidad resistencia antimicrobiana y al experimentar con alta frecuencia variación antigénica y de fase de estructuras de superficie (Sparling *et al.*, 1986). Ambos mecanismos aseguran un nivel alto y continuo de prevalencia de la enfermedad gonocócica (Easmon y Ison, 1987).

Se ha demostrado que la infección gonocócica ocurre en dos fases. Primero la adhesión a la mucosa y segundo la invasión de la célula epitelial. En una etapa inicial de la adhesión intervienen factores no específicos como: carga negativa de superficies de ambos elementos (gonococo y célula huésped), pH e interacciones hidrofóbicas (Watt y Ward, 1980). Estructuras específicas de superficie como los pelos, proteínas de membrana externa (OMP) como la PII u Opa y el Lipooligosacárido (LOS) median también esta asociación con la célula epitelial. El gonococo puede adherirse a células ciliadas y no ciliadas (demostrado en cultivo de células de trompas de Falopio humanas) (McGee *et al.*, 1978). Después de adherirse, invade y entra a la célula epitelial, pasando a través de la célula en el interior de vacuolas a la matrix subepitelial, donde el gonococo usualmente permanece localizado y causa una intensa reacción inflamatoria (Arvidson *et al.*, 1999). Las células ciliadas son dañadas por un efecto tóxico del LOS del gonococo (Gregg *et al.*, 1981). Se ha descrito la capacidad de la OMPI para transferirse e insertarse espontáneamente a membranas celulares con doble capa lipídica. Esta proteína es capaz de unirse, además, a determinada molécula reguladora de la célula eucariota. El efecto de estas actividades en la patogenia no está suficientemente claro, pero parece razonable que OMPI media en eventos importantes de la célula huésped que contribuye a la sobre vivencia del microorganismo. Algunos consideran que la transferencia de esta proteína de membrana a membrana constituye una primera señal en el proceso de invasión al interior de la célula epitelial (endocitosis) (Blake y Gotschlich, 1987; Judd, 1989; Muller *et al.*, 1999). En el interior de las células, el gonococo se multiplica, alcanza eventualmente el lado interno de la lámina basal y se desarrolla la infección (Easmon y Ison, 1987).

II.5.1. Pelos

Los pelos son apéndices proteicos, filamentosos también llamados fimbrias, que se extienden 4 μm sobre la superficie celular (Swanson *et al.*, 1971). Los mismos están constituidos de una serie de repeticiones idénticas de subunidades proteicas, la "pilina", la cual tiene un peso molecular que oscila entre 16 000 y 23 000 Daltons. Resulta interesante el hecho de que la "pilina" procedente de colonias opacas de *N. gonorrhoeae*, tenga diferente peso molecular de aquella procedente de colonias transparentes (Jephcott, 1971).

Los pelos están asociados con dos tipos distintivos de colonias (1 y 2). Estudios realizados en individuos voluntarios, aislamientos clínicos recientes formadores de este tipo de colonia tienen la habilidad de causar infección. Las colonias no piliadas aparecen en pases o subcultivos sucesivos dando lugar a las colonias tipo 3 y 4, las cuales son menos infectivas (Easmon y Ison, 1987). Los pelos constituyen los mediadores primarios de la adherencia y han llamado la atención desde un comienzo como candidatos potenciales de vacuna. Los dominios antigénicos y funcionales de los pelos del gonococo han sido determinados. La "pilina" tiene de 175 a 180 aminoácidos. Ésta puede ser químicamente separada en tres segmentos por el uso del bromuro de cianógeno. El primer segmento (CB-1) contiene los primeros siete aminoácidos y se encuentra localizado en la región N-terminal. El fragmento central CB-2 abarca desde el 8 al 96 aminoácido, mientras que el tercero, ubicado en la porción carboxiterminal, del 97 al 177 aminoácido. El fragmento CB-2 es similar y/o conservado entre las diferentes cepas de *N. gonorrhoeae* y, además, parece contener el sitio de la molécula que es importante en el ataque a la membrana celular del hospedero. La porción N-terminal de la molécula también tiene una secuencia conservada de aminoácidos entre las diferentes cepas, es de naturaleza hidrofóbica y se asocia con la parte hidrófoba de otra molécula de "pilina" con la inserción de una subunidad proteica sobre el límite de otra para formar un pelo. La región carboxi-terminal tiene una alta variabilidad de la secuencia aminoacídica entre cepas (heterogeneidad antigénica) y es muy inmunogénica (Schoolnik *et al.*, 1983; Schoolnik y McGee, 1985).

II.5.2. Proteínas de membrana externa (OMPs)

La proteína I (PI) es una porina B, es la más dominante de todas las OMPs y está presente en todos los aislamientos de *N. gonorrhoeae* (alrededor del 60% de la membrana externa) (Derrick *et al.*, 1999). Por esta razón, ha sido también usada en algunos estudios como candidato vacunal (Easmon y Ison, 1987). La Por B del gonococo existe como dos alelos o dos formas de PI (PIA y PIB o WI y WII/III en la nomenclatura Suiza), las cuales comparten un 80% de homología. La diversidad de la porción expuesta en la superficie de la membrana externa entre cepas representa un dilema en el comportamiento antigénico y respuesta inmunogénica del huésped re infectado. Sobre la base de tal variabilidad “intercepa” se dispone de un método preciso de serotipificación, el cual permite monitorear la prevalencia y diseminación de cepas dentro de una población determinada y correlacionar diferencias funcionales entre cepas con diferentes tipos estructurales (Judd, 1989). La PI forma poros hidrofílicos en asociación con la proteína III en la membrana externa; el diámetro de dichos poros se estima en 2,5 nm y constituyen canales anión-selectivos para el Cl^+/K^+ (6:1 para PIB y 3:1 para PIA) (Blake y Gotschlich, 1987, Judd, 1989), esta función es regulada por GTP/ATP (Muller *et al.*, 1999).

La expresión de la PII contribuye a la adherencia del gonococo a las células epiteliales “in vitro” por lo que ha despertado gran interés en los últimos años. La PII pertenece a una familia de proteínas modificables por el calor con un peso molecular de alrededor de los 24-32 000 Daltons (Blake y Gotschlich, 1983). Una sola cepa puede expresar desde ninguna hasta seis PII con características antigénicas diferentes. La expresión de PII está sujeta a variaciones antigénicas y de fase (Sparling *et al.*, 1986). Las cepas que expresan PII forman colonias opacas, y su ausencia origina colonias transparentes. Las colonias de cepas aisladas de hombres con infección no complicada y desde el endocervix de mujeres en determinado momento del ciclo menstrual son opacas, mientras que aquellas procedentes de infección diseminada y de endocervix durante la menstruación son transparentes (James y Swanson, 1978). De estas observaciones se infiere que la falta de expresión de la proteína II facilita de alguna forma la invasión para causar enfermedad sistémica. Aunque la PII ha sido bien relacionada con la adherencia, la susceptibilidad a la actividad bactericida normal del suero humano, y la interacción con polimorfonucleares (Easmon y Ison, 1987).

El gonococo puede evadir la actividad bactericida del suero mediante la expresión de una proteína modificable por reducción (Rmp - anteriormente conocida como mproteína III). Esta

proteína tiene un peso molecular de 30 000 en ausencia del agente reductor y del 31 000 seguida de la reducción; es altamente inmunogénica y es similar en estructura a proteínas de otras Neisserias y Enterobacterias. Probablemente anticuerpos para estas últimas proteínas cruzan de forma homóloga y reaccionan con la Rmp resultando en la neutralización de la actividad bactericida (Kihlstrom y Danielsson, 1994).

II.5.3. Lipooligosacáridos

El gonococo produce una cantidad sustancial de polifosfato extracelular, el cual puede excluir la tinta china y simula una cápsula verdadera. Sin embargo, el polifosfato no es antigénico, y es probable que los informes tempranos sobre la presencia de polisacárido capsular en el gonococo fueran en efecto debido al aislamiento de LOS (Gotschlich, 1984). El LOS ha tenido un sostenido interés como candidato vacunal, ya que los anticuerpos contra este son bactericidas. El gonococo tiene LOS en la membrana externa. Este LOS tiene una estructura similar a aquella de ciertas bacterias gramnegativas excepto que en estos están ausentes las cadenas O-laterales antigénicas. El lípido A puede contribuir a las manifestaciones sistémicas vistas en la forma diseminada de la infección gonocócica (Barnes y Holmes, 1984). El LOS, además, puede ser modificado en el gonococo por sialilación de residuos de galactosa. Por este medio en el gonococo se simulan epítomos presentes en la célula huésped, evitando, por consiguiente, algunas respuestas del huésped como la actividad bactericida del suero, activación del complemento y formación de anticuerpos (Anónimo, 2001).

II.5.4. Proteasa IgA

La proteasa IgA no constituye uno de los agentes de superficie del gonococo, sino la primera exoproteína descrita. La proteasa IgA1 es una enzima producida por las neisserias patógenas, *Neisseria meningitidis* y *N. gonorrhoeae* pero no por neisserias comensales. Su función es cortar la subclase IgA1, por lo tanto es considerada un determinante de virulencia. Un segundo papel biológico de esta enzima ha sido propuesto como su influencia indirecta en la sobre vivencia del gonococo al nivel intracelular al alterar las proteínas lisosomales (Lind *et al.*, 1997; Ayala *et al.*, 1998).

II.5.5. H.8 y Azurina modificada por lípidos (Laz)

Cannon *et al.* (1984) también describieron un antígeno denominado H.8 el cual es encontrado en *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*. H.8 es una macromolécula expuesta en la superficie del microorganismo, inmunogénica y compuesta de lípidos y proteína, los anticuerpos inducidos por ella no son protectores (Behr *et al.*, 1989; Trees *et al.*, 1990).

II.6. Diagnóstico de la enfermedad gonocócica

II.6.1. Diagnóstico clínico

Neisseria gonorrhoeae causa infección tanto del tracto genital (asintomática y sintomática) como extra-genital. Existe un amplio espectro de presentaciones clínicas y también considerable superposición de síntomas con otras enfermedades de transmisión sexual, particularmente con aquella producida por *Chlamydia trachomatis*. Algunos ejemplos de presentación y problemas asociados con el diagnóstico son como sigue:

- *Infección gonocócica no complicada*

Las formas más frecuentes son uretritis en el hombre y cervicitis en la mujer. En el hombre, período de incubación se considera entre 1 y 57 días con una media de 5,8 días desde el contacto. En el hombre con uretritis se observa secreción uretral purulenta en alrededor del 80% de los casos y ardor al orinar en la mitad de ellos. En un inicio, la descarga puede ser escasa y serosa. Un 10% de los pacientes pueden estar asintomáticos al momento del diagnóstico y muchos de estos podrían ser considerados como pre-sintomáticos (Sherrard y Balow, 1996). Las mujeres con cervicitis pueden presentar algunas veces una secreción vaginal abundante y, mucopurulenta. La infección uretral puede también estar presente del 70 al 90% de los casos; cuando estas mujeres han sido íntimamente entrevistadas reconocen la presencia de una secreción, la que, sin embargo, no fue suficientemente molesta como para solicitar atención médica o utilizar algún remedio. El período de incubación de la enfermedad en la mujer es muy difícil de determinar debido a la alta frecuencia (mayor que el hombre) de formas asintomáticas, y porque si la descarga vaginal está presente puede ser causada por otros microorganismos como *C. trachomatis* y *Trichomona vaginalis*. Un exudado que es usualmente

purulento o mucoso puede salir a través de la uretra y conductos de las glándulas periuretrales y de Bartolino. Otros síntomas en la mujer pueden ser la disuria, sangramiento uterino intermenstrual y menorragia, la fiebre y el dolor pueden estar presente (Evangelista y Beilstein, 1993).

- *Infección extra-genital*

Ésta incluye las áreas ano, orofaringe y conjuntiva ocular. La proctitis se asocia con dolor ano-rectal, tenesmo y secreción rectal purulenta, aunque muchas infecciones en estas localizaciones son también asintomáticas; la incidencia de la gonorrea ano-rectal en mujeres con cervicitis ha sido reportada entre un 35 y 50%. La infección de la faringe es usualmente asintomática tanto en el hombre como en la mujer (90% de los casos) y desaparece espontáneamente en un período de 10 a 12 semanas. Los pacientes pueden tener tonsilitis o faringitis y ocasionalmente fiebre y linfadenopatías cervicales; los pacientes con faringitis gonocócica pueden tener mayor riesgo de desarrollar infección gonocócica diseminada (Handsfield, 1990; Hook y Handsfield, 1990, Evangelista y Beilstein, 1993). En las infecciones oftálmicas la forma clínica más comúnmente reconocida es la oftalmía *neonatorum* (conjuntivitis). La incidencia reportada de esta infección en recién nacidos que no reciben la profilaxis con nitrato de plata al 1% es de 0 a 5% (Gutman y Wilfert, 1990). La infección del ojo puede ocurrir también en el adulto y en ambos casos se observa un exudado profuso de color amarillo-grisáceo, después de establecerse en el epitelio conjuntival el gonococo invade el tejido subepitelial con el riesgo de progresión de la enfermedad con involución de la cornea y perforación del globo ocular (Evangelista y Beilstein, 1993). En epidemias recurrentes en Australia se ha visto una forma de enfermedad oftálmica no progresiva en niños (Merianos *et al.*, 1995). Aunque el gonococo comúnmente no causa infección del tracto urinario, ha estado asociado a un síndrome uretral agudo en algunas mujeres con edad entre los 15 y 24 años (Holmes, 1990).

- *Enfermedad gonocócica complicada*

Las complicaciones más comunes de ambas localizaciones (genital y extra-genital) de la gonorrea ocurren en mujeres y recién nacidos. Las infecciones del tracto reproductivo ascendente en la mujer (enfermedad inflamatoria pélvica), tienen múltiples presentaciones (endometritis, salpingitis, abscesos tubo-ováricos o peritonitis) y es causada por un número de

diferentes agentes etiológicos solos o en combinación. *N. gonorrhoeae* es una causa prominente de este síndrome y el daño que produce en las trompas de Falopio propician el embarazo ectópico y la esterilidad, secuelas bien reconocidas (Evangelista y Beilstein, 1993).

Alrededor del 1-2% de la infección mucosa puede llegar a convertirse en una infección diseminada (EGD), lo cual es más frecuente en la mujer. El porcentaje de EGD visto en la comunidad depende mucho del subtipo de gonococo prevalente (Knapp y Holmes, 1975; Tapsall *et al.*, 1992). La presentación de esta forma clínica está dada usualmente por combinación de síntomas sistémicos de intensidad media, una artritis infecciosa, erupción o lesiones cutáneas y tenosinovitis (Ross, 1996). En un estudio realizado en Nairobi, la infección gonocócica durante el embarazo constituyó un factor de riesgo independiente para el nacimiento prematuro y con bajo peso (Elliott *et al.*, 1990)

A la lista de complicaciones tradicionales y bien reconocidas se puede adicionar ahora el significativo incremento de la transmisión sexual del VIH lo cual ocurre en la presencia de gonorrea (Cohen, 1998). Esto parece ser el resultado de un incremento en la carga del VIH en el semen (Cohen *et al.*, 1997) o en el fluido cervico-vaginal (Ghys *et al.*, 1997; Mostad *et al.*, 1997) de pacientes con gonorrea y un incremento de células blanco para el VIH en el exudado inflamatorio que acompaña a las ITS sintomáticas (Levine *et al.*, 1998).

II.6.2. Diagnóstico de laboratorio.

Una prueba diagnóstica ideal es aquella que es rápida, de manera que los resultados estén disponibles mientras el paciente espera, fácil de desarrollar, de un bajo costo, que emplea muestras obtenidas por métodos no invasivos, confiable, reproducible, con alta sensibilidad y especificidad, y que no requiera un equipamiento especial (Tapsall, 2001). Adicionalmente, debe tener un requisito esencial en el diagnóstico de la gonorrea, y es que debe ser capaz de proveer o hacer factible el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de gonococo con el fin de apoyar las estrategias de control por el sistema de salud pública (Tapsall, 2001).

Aunque tal prueba no existe aún, hay una variedad de métodos disponibles para el diagnóstico de la enfermedad gonocócica basados o no en el cultivo microbiológico. Estos métodos

pueden ser llevados a cabo de manera individual o en varias combinaciones según la necesidad, los recursos y diferentes propósitos (Tapsall, 2001).

- *Sitios de recolección y transporte de la muestra*

La selección del sitio toma de muestra para el diagnóstico de la gonorrea depende de los síntomas clínicos y práctica sexual del paciente, así como de su edad y género. Los sitios primarios de preferencia son la uretra en el hombre y el endocervix en la mujer. A pesar de ello, la obtención de una muestra adicional de la zona ano-rectal incrementa la sensibilidad del cultivo. Además, la muestra ano-rectal puede ser utilizada para una prueba de cura siguiendo la terapia antimicrobiana en mujeres y hombres homosexuales, ya que el cultivo rectal puede ser positivo cuando el cultivo uretral y cervical son negativos (Mardh, 1984). La recolección de muestras desde el orificio vaginal no es recomendado; sin embargo, tales muestras pueden ser tomadas desde el fondo de saco vaginal posterior en pacientes pediátricos, pacientes con himen intacto y de fondo de la vagina en pacientes con histerectomía total; otros sitios de donde tomar muestra son la orofaringe, la conjuntiva ocular, secreciones de glándulas de Bartolino, fluido prostático, endometrio, sangre, aspirado de articulaciones y lesiones de la piel (Evangelista y Beilstein, 1993). Los hisopos preferidos para la toma de muestra son los de dacrón, rayón o alginato de calcio sobre una varilla de plástico o aluminio. Los hisopos de algodón deben ser usados sólo para inoculación directa o inmediata sobre el medio de cultivo o cuando se dispone de un medio de transporte que contiene carbón activado que absorbe las sustancias tóxicas como los ácidos grasos (Evangelista y Beilstein, 1993).

La inoculación directa sobre el medio de cultivo ofrece las mayores posibilidades de resultados positivos o aislamiento. Los medios de cultivos selectivos usados para el crecimiento de *N. gonorrhoeae* son: Thayer-Martin modificado (TMM) (Martin *et al.*, 1974), Martin Lewis (Martin *et al.*, 1977), New York City (Faur *et al.*, 1973) y GC-Lect (Evans *et al.*, 1989). Antes de 30 minutos después de la inoculación, las placas de medios inoculados deben ser incubadas a 35 hasta 37°C en una incubadora con atmósfera de CO₂ o en jarra de extinción de vela, la cual garantiza una concentración de 3% de CO₂ aproximadamente. Las placas pueden ser incubadas durante 24 a 48 horas y después ser transportadas (Evangelista y Beilstein, 1993).

Debido a que el pase directo al medio de cultivo podría no ser siempre posible se han desarrollado métodos alternativos para el cultivo y transporte. Los sistemas de transporte nutritivos tienen incorporado un medio adecuado para el crecimiento del gonococo y la presencia de CO₂ en el ambiente. Estos sistemas garantizan la viabilidad del microorganismo por largo período de tiempo y el transporte de la muestra a los laboratorios diagnósticos, garantizando incluso la recuperación de pequeños inóculos (Evangelista y Beilstein, 1993). El primer sistema, Transgrow, fue diseñado y reportado en 1971 por Martin y Lester (Martin y Lester, 1971); un sistema que ha ganado mayor aceptación en los laboratorios es el JEMBEC (siglas de John E. Martin Biological Environmental Chamber), descrito en 1975 (Martin *et al.*, 1975), mientras que otros sistemas nutritivos descritos son los sistemas Isocult, Bio-Bag y el Gono-Pack, cuyos principios son muy similares al JEMBEC (Evangelista y Beilstein, 1993).

Otra alternativa de transporte de las muestras son los sistemas no nutritivos. Uno de los primeros medios usados para el transporte de muestras de gonococo a laboratorios de diagnóstico fue el medio de transporte de Stuart (Stuart *et al.*, 1954), posteriormente Amies modificó el medio de Stuart en 1967, eliminando el azul de metileno como indicador y sustituyendo un tampón de fosfato inorgánico por el glicerofosfato de sodio para disminuir el sobre-crecimiento de contaminantes (Amies, 1967).

Ambas formulaciones soportan muy bien la viabilidad del gonococo por 12 horas, sin embargo, a las 24 horas la viabilidad puede ser del 5-10% más baja y a las 48 del 50%. Los medios de transporte no nutritivos tienen la ventaja de ser simples, relativamente poco costosos y fáciles de almacenar con una larga vida a temperatura ambiente (Evangelista y Beilstein, 1993).

- *Examen microscópico directo*

El método de elección es la coloración de Gram. El diagnóstico de gonorrea puede ser hecho por este método cuando el paciente es masculino y sintomático (uretritis). La coloración de Gram del exudado uretral de hombres se correlaciona con el cultivo en un 98% de sensibilidad y 100% de especificidad (Handsfield, 1990). En hombres asintomáticos la sensibilidad es del 50 al 70%, siendo necesario realizar el cultivo (Hook y Handsfield, 1990). Los exudados endocervicales deben ser siempre cultivados para el diagnóstico, pues el examen directo con la

coloración de Gram tiene una sensibilidad de solamente el 50 al 70% en gonorrea no complicada y del 60 al 70% cuando se asocia a enfermedad inflamatoria pélvica (Hook y Handsfield, 1990). Sin embargo, los exudados endocervicales que contienen diplococos gramnegativos intracelulares tienen un alto valor predictivo para mujeres sintomáticas o con alto riesgo para la infección, pero esto no debe sugerir el reemplazo del cultivo en esta clase de muestra (Evangelista y Beilstein, 1993).

- *Cultivo e identificación de N. gonorrhoeae*

Los sistemas basados en el cultivo tienen una alta especificidad, pero son costosos y requieren personal entrenado en el manejo de gérmenes fastidiosos, pues aún la manipulación básica para la inoculación del cultivo puede ser inexpertamente llevada a cabo (Carlin *et al.*, 1997). Existen dos requerimientos básicos para un medio de cultivo de gonococo confiable: el suplemento enriquecedor para el soporte del crecimiento de *N. gonorrhoeae* y el suplemento selectivo que propicia la recuperación de *N. gonorrhoeae* desde un sitio de muestra en el cual existe una amplia y numerosa flora microbiana. Las formulaciones básicas de los cuatro medios de cultivos más usados es una base de “agar almidón-peptona fosfato-tamponada”. El más ampliamente usado es el medio de TMM, el cual contiene hemoglobina, el suplemento definido IsoVitalex y cuatro agentes inhibidores como la vancomicina (3 µg/mL) para inhibir bacterias grampositivas y colistina (7,5 µg/mL) para inhibir microorganismos gramnegativos, incluyendo neisserias no patógenas. Este medio contiene también 12,5 µg/mL de nistatina para inhibir levaduras y 5 µg/mL de lactato de trimetoprima para inhibir *Proteus* spp. La amplia variedad de medios disponibles y el continuo refinamiento de estos sugiere que ninguno combina de manera perfecta estos dos requerimientos. Sin embargo, ambas propiedades nutriente y selectiva de estos medios han sufrido un significativo desarrollo por lo que la sensibilidad del cultivo como una herramienta diagnóstica se ha incrementado de manera importante (Evangelista y Beilstein, 1993; Anónimo, 1999a).

Existen un número de técnicas disponibles para la identificación de *N. gonorrhoeae* y su aplicación y uso depende de la disponibilidad de recursos, habilidades y otras circunstancias (Knapp, 1988 a,b). La identificación presuntiva, basada en el crecimiento en un medio selectivo de agar base GC, morfología en la coloración de Gram del crecimiento bacteriano y

una prueba de “oxidasa” y “superóxido” (Young *et al.*, 1984) positiva, es considerada en muchos lugares y circunstancias como suficiente para el diagnóstico de gonorrea, especialmente si el crecimiento proviene desde el tracto genital.

En países del llamado primer mundo, la identificación definitiva es más usual, especialmente desde sitios extragenitales. Esta identificación depende de los criterios antes mencionados y el empleo de una o más técnicas que demuestran la utilización de carbohidratos, características inmunológicas y/o perfiles de enzimas típicos de este microorganismo (Knapp y Rice, 1995).

La producción de ácido en un medio que contiene glucosa como sustrato, pero no en aquellos suplementados con otros azúcares como la lactosa, sacarosa, maltosa y fructosa sugiere la presencia de *N. gonorrhoeae*. Esta prueba es la menos exigente, la más barata y más confiable. Existen otras pruebas confirmatorias del cultivo como la co-aglutinación (Phadebact Monoclonal GC Test), de anticuerpos fluorescentes (prueba de confirmación de cultivos de *N. gonorrhoeae* Syva Micro Trak), pruebas de degradación rápida de hidratos de carbono como API Quad FERM+ (Analytab Products, Plainview, N.Y.), sistemas rápidos de sustratos cromogénicos (Gonochek II test, E-Y Laboratories, San Mateo, Calif.), sistemas rápidos de combinación bioquímica (Vitek NHI card, Biomerieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo.) y técnicas de hibridación DNA AccuProbe (Gen-Probe, Inc., San Diego, Calif.). Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana deben ser realizadas siempre que sea posible (Dillon *et al.*, 1988; Rein, 1991; Evangelista y Beilstein, 1993).

Aunque el costo del cultivo del gonococo no es excesivamente alto, el interés en métodos que no dependen del cultivo se ha estimulado por el costo del establecimiento de un laboratorio con requisitos para el manejo o manipulación de microorganismos patógenos, tiempo necesario para la identificación (48-72 horas) y el fracaso del cultivo para detectar algunos microorganismos sensibles a las condiciones de cultivo y transporte. Algunos de estos métodos son la prueba de amebocitos *Limulus* (Gonoscreen, Mallinckrodt, St Louis, Mo), detección de oxidasa (Gonodecten, United States Packaging Corp., La Porte, IN) y ensayo inmunoenzimático (Gonozyme, Abbott Diagnostics, Chicago, IL). Algunas de las desventajas de estos métodos la necesidad de una abundante descarga o secreción para el procedimiento, una baja especificidad de la prueba y una baja sensibilidad en muestras endocervicales (Rein, 1991; Zubrzycki, 1990).

- *Técnicas moleculares para el diagnóstico de N. gonorrhoeae*

Las técnicas moleculares disponibles hoy día no han aventajado al cultivo de manera significativa desde el punto de vista de sensibilidad y especificidad (Koumans, 1998; Peeling, 1999).

Las dificultades en la colección de muestras y diagnóstico basado en el cultivo han acelerado el desarrollo y aplicación de pruebas de detección de ácidos nucleicos, con o sin amplificación de éste. Estas técnicas proveen resultados altamente confiables, minimizan las dificultades de colección de la muestra y son menos exigentes respecto a requerimientos de transporte. Dos factores limitan la aplicación más amplia de estos métodos aún en los países desarrollados. La principal consideración es el costo y la segunda, de significativa importancia, es que no permiten hasta ahora la vigilancia de la susceptibilidad antimicrobiana (Tapsall, 2001), un factor esencial en el control de la enfermedad.

Algunos de estos métodos son las pruebas de hibridación de ácido nucleico (sondas con marcaje quimioluminiscentes) y ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (RCP) y Reacción en Cadena de la Ligasa (RCL) capaces de detectar una sola copia viable o no del microorganismo. En el primer método la sensibilidad ha sido de alrededor del 85% y la especificidad del 99%; en el segundo, revisiones sistemáticas estiman una sensibilidad del 95%. (Koumans, 1998).

De forma general, pueden surgir resultados falsos positivos debido a la contaminación de las muestras transportadas largas distancias (Peeling *et al.*, 1999) y falsos negativos por la presencia natural de un amplio rango de inhibidores de la RCP en los fluidos corporales (Tabrizi *et al.*, 1998).

El desarrollo de la tecnología de amplificación bajo condiciones isotérmicas ya está en uso para algunos ensayos comerciales en un grupo de patógenos, y prospectos miniaturizados usando reactivos estables a temperatura ambiente están siendo revisados actualmente (Peeling *et al.*, 1999).

II.7. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos en *N. gonorrhoeae*

El gonococo, altamente susceptible a los antibióticos en un comienzo, tiene una gran capacidad de adaptación a las condiciones adversas. Un medio en el que los antimicrobianos estén presentes puede inducir cambios múltiples acumulativos en el microorganismo, lo cual resulta en resistencia a estos agentes. Clínicamente, este fenómeno se traduce en fracasos terapéuticos (Reyn *et al.*, 1958).

En 1937 comenzaron a emplearse las sulfonamidas en el tratamiento de la enfermedad gonocócica. Inicialmente curaban el 95% de los casos y menos del 10% mostraba resistencia “in vitro”; en pocos años el fallo clínico-terapéutico se observó en el 80% de los pacientes. En 1943, la penicilina G comenzó a emplearse en dosis de 50 000 U/día, y los aislamientos eran uniformemente sensibles. Sin embargo, a fines de la década del cincuenta se detectó en Europa un aumento de la resistencia a este antimicrobiano. Antes de 1955 el 0,6% de las cepas requerían más de 0,03 µg/mL de penicilina para inhibir su crecimiento; en 1965, fue el 42% y en 1969, el 65%. Todo esto llevó a incrementar la dosis hasta 4 800 000 U/día (dosis actual), ante la cual han aparecido nuevos informes de fracasos terapéuticos (Dunlop, 1949; Del Love y Finland, 1955; Holmes, 1973; Kampmeier, 1983).

De manera similar han aparecido cepas con resistencia a la tetraciclina, ya en 1972 el tratamiento de la gonorrea con una monodosis de este fármaco era inefectiva (Weisner, 1973).

En 1975 se identificaron plasmidios que codificaban para la producción de enzima beta-lactamasa en cepas de *Haemophilus influenzae*. En 1976 se aislaron simultáneamente en el Reino Unido y Estados Unidos las primeras cepas de gonococo productoras de penicilinas (PPNG) (las cuales exhibían altos niveles de resistencia a la penicilina) y se encontraron dos plasmidios de resistencia con una talla molecular de 3,2 MDa (tipo Africano) y 4,4-4,7 MDa (tipo Asiático) respectivamente. Desde entonces se han descrito otros seis tipos de plasmidios de resistencia para la penicilina: el de 2,9 MDa (Variedad Río), el de 3,05 MDa. (Variedad Toronto), el de 4,0 MDa. (Variedad Nimes), el de 6,0 MDa. (Variedad Nueva Zelanda) y los más recientemente reportados, en 1997, el de 3,9 MDa. y el de 2,2 MDa. (Falkow, 1976; Roberts, 1989; Knapp *et al.*, 1997a; Pillay *et al.*, 1997).

En el año 1985 se reporta por primera vez en los Estados Unidos la circulación de aislamientos de *N. gonorrhoeae* expresando alto nivel de resistencia a la tetraciclina (TRNG); aunque un estudio retrospectivo llevó al descubrimiento de un aislamiento en 1983 (Center for Diseases Control, 1985). Todas las cepas TRNG portan un plasmidio de aproximadamente 40,6 kb (25,2 MDa) el cual posee el determinante *tet-M* de resistencia (Gascoyne *et al.*, 1991).

Los mecanismos de resistencia (Anónimo, 1999 b) en el gonococo pueden ser agrupados como:

1. Aquellos que reducen el acceso del antimicrobiano al sitio blanco
 - Cambios en la permeabilidad de las proteínas porinas, las cuales impiden la entrada del antimicrobiano.
 - Mecanismo de bombeo el cual elimina el antimicrobiano desde el interior del microorganismo.
 - Destrucción del antibiótico antes de actuar sobre el microorganismo.
2. El sitio de acción del antimicrobiano dentro del gonococo, el sitio blanco, puede ser alterado o eliminado de modo que el agente no tiene un sustrato donde actuar (Tapsall, 2001).

Genéticamente, estos cambios pueden ser mediados por elementos “cromosomales y extracromosomales” (plasmidios). Además, múltiples mecanismos de resistencia pueden coexistir en el organismo de modo que puede emerger la resistencia incrementada o acumulada para un solo agente, y ocurrir la resistencia combinada a varios antimicrobianos en una sola cepa (Tapsall, 2001).

La resistencia mediada por cambios cromosomales: se desarrolla y se disemina generalmente de forma lenta; la transferencia de genes ocurre por transformación y los niveles de resistencia clínicamente significativos involucran múltiples mutaciones. Para ello se requiere la transferencia de varios genes, lo cual ocurre a una frecuencia baja (Johnson y Morse, 1988).

La resistencia extracromosomal mediada por plasmidios: se encuentra limitada hasta el presente para las penicilinas y tetraciclinas en el gonococo. Ésta requiere la presencia de un plasmidio conjugativo, el cual determina la tasa de diseminación de los plasmidios de resistencia

(plasmidios R). El plasmidio conjugativo es autotransferible, de modo que las cepas receptoras pueden convertirse a sí mismas en donadoras (Johnson y Morse, 1988).

II.7.1. Penicilinas:

Los sitios blancos para las penicilinas y cefalosporinas son las proteínas fijadoras de la penicilina (PBPs) de pared celular en el gonococo. Alteraciones en la PBP-1 y PBP-2 disminuyen la capacidad de las penicilinas para ligarse al sitio blanco, incrementando por lo tanto la resistencia intrínseca del microorganismo a estos agentes (Dougherty, 1985). La producción de la PBP-2 es codificada por el gen *penA* (Sparling *et al.*, 1975). Adicionalmente, cambios en otros locus como el *mtr* y *penB* producen efectos acumulativos. Las mutaciones en el locus *mtr* resultan en el incremento de la resistencia a un amplio rango de antimicrobianos, detergentes y colorantes (Guymon y Sparling, 1975) a través de un sistema de bomba de vaciamiento (Hagman *et al.*, 1995), mientras que mutaciones en el locus *penB* alteran la permeabilidad de la pared celular para antimicrobianos hidrofílicos y otros compuestos (Gill *et al.*, 1998).

El gonococo expresa una sola porina de la cual existen dos alelos, mientras el meningococo tiene dos porinas A y B. El gonococo también tiene un pseudogen el cual no es expresado (Feavers y Maiden, 1998).

El efecto combinado de estos cambios trae consigo el incremento de la CIM de la penicilina a unas 120 veces (Johnson y Morse, 1988). Los gonococos con estos cambios son llamados *N. gonorrhoeae* cromosomalmente resistentes (CMRNG) (Ison, 1996). Estos fenómenos también resultan en susceptibilidad disminuida a las cefalosporinas (Ison *et al.*, 1990), a las tetraciclinas (Sparling *et al.*, 1975) y otros agentes (Bygdeman *et al.*, 1984).

Los dos alelos de la *por* son PIA y PIB correspondientes a WI o WII/WIII en la nomenclatura suiza (Knapp *et al.*, 1985) y forman serogrupos mutuamente exclusivos. Cepas CMRNG están asociadas con el serogrupo IB (WII/WIII) (Bygdeman, 1988).

La resistencia a las penicilinas también ocurre por plasmidios, los que codifican para la producción de una β -lactamasa tipo TEM-1. Esta enzima hidroliza el anillo β -lactámico de antibióticos tipo penicilina convirtiéndolos en una forma no activa. En contraste con la lenta evolución del incremento paso a paso de la resistencia cromosomal, la resistencia plasmídica cambia la condición del germen susceptible a un estado de alto nivel de resistencia en un solo evento (Tapsall, 2001).

Ambos mecanismos de la resistencia a la penicilina pueden coexistir en un solo aislamiento, lo cual es relevante debido al uso clínico y la existencia de inhibidores de las β -lactamasas como el ácido clavulánico. Así, la efectividad terapéutica de la combinación de una penicilina y un inhibidor de la β -lactamasa en cepas PPNG depende de la presencia o no de resistencia intrínseca del gonococo.

II.7.2. Cefalosporinas

La resistencia a estos antimicrobianos es de tipo cromosomal y similarmente debido a los mismos cambios que acontecen para la susceptibilidad disminuida para la penicilina (Johnson y Morse, 1988; Ison y Bindyana, 1990). Resistencia cruzada para la penicilina y cefalosporinas tempranas como la cefuroxima se han descrito (Rice *et al.*, 1986, Ison y Bindyana, 1990). Sin embargo, esto no se ha traducido para las cefalosporinas de últimas generaciones como la ceftriaxona y la cefixima (Tapsall, 2001).

Cefalosporinas constitutivamente encontradas en muchos otros géneros gramnegativos no han sido detectadas en *N. gonorrhoeae*. Si tal evento ocurriera sería devastador en los programas de tratamiento de la gonorrea, los cuales son dependientes del uso de las cefalosporinas de tercera generación (Tapsall, 2001).

II.7.3. Espectinomicina y aminoglucósidos

La resistencia a la espectinomicina ocurre en un sólo paso, un evento mediado cromosomalmente el cual resulta en un alto nivel de resistencia a este agente. La resistencia se debe a cambios ribosomales (Maness *et al.*, 1974). Existe la posibilidad de que el gonococo adquiera y mantenga genes de origen plasmídico con información para la destrucción de

antibióticos aminoglucósidos. Las elevadas CIMs para gentamicina reportada en algunos estudios parecen ser por mecanismos relacionados con las porinas (Johnson y Morse, 1988).

II.7.4. Quinolonas

Las quinolonas más usadas en el tratamiento de la gonorrea son la ciprofloxacina y la ofloxacina. La resistencia a estos antimicrobianos se ha incrementado a través de los años de manera similar a como ha ocurrido con la penicilina; en este suceso están involucrados múltiples cambios a nivel del cromosoma (Tapsall, 2001).

Los sitios blanco para las quinolonas son las topoisomerasas o ADN girasas de los microorganismos. Altas CIMs y resistencia clínicamente importante se deben a alteraciones que ocurren inicialmente en el gen *gyrA*. Múltiples cambios de aminoácidos han sido descritos y cuando estos son combinados, pueden resultar en un alto nivel de resistencia. Alteraciones en el gen separado *parC* también resulta en un alto nivel de resistencia. Cambios en este último gen parecen ocurrir sólo si previamente existen cambios en el gen *gyrA* (Ison *et al.*, 1998 a).

Quinolonas de cuarta generación están ahora disponibles, las que tienen una actividad mayor contra aislamientos con alteraciones en el gen *gyrA*, pero son inefectivos contra cepas con alteraciones en *parC* (Ison *et al.*, 1998 a,b). Una de estas quinolonas, la trovafloxacina ha sido retirada por sus efectos tóxicos.

II.7.5. Tetraciclinas:

Las tetraciclinas no son recomendadas para el tratamiento de la gonorrea debido a que deben ser administradas en múltiples dosis por varios días. Sin embargo, son poco costosas y ampliamente usadas en sectores con una política informal de la salud (Tapsall, 2001).

La resistencia a la tetraciclina tiene origen cromosomal y plasmídico, esto último es responsable de la resistencia de alto nivel. La resistencia cromosomal está ligada a alteraciones en el locus *mtr* y *penB*, las cuales reducen también la susceptibilidad a la penicilina (Johnson y Morse, 1988). Nuevamente la agregación de éstas y otras mutaciones producen un incremento de las CIMs que son clínicamente significativas (Faruki *et al.*, 1985).

El alto nivel de resistencia a la tetraciclina en el gonococo (TRNG) es el resultado de la adquisición de un plasmidio de 25,2 MDa que porta el determinante *tet-M* reportado por primera vez en 1986 (Morse *et al.*, 1986). En *N. gonorrhoeae* el determinante *tet-M* existe como dos tipos, el Holandés y el Americano (Gascoyne-Binzi *et al.*, 1993). Un estudio de la epidemiología molecular de los genes *tet-M* por RCP sugiere que el tipo Holandés (Dutch) pudo tener su origen en el lejano Oriente y el Americano en el continente africano (Turner *et al.*, 1999). El determinante *tet-M* está ampliamente disperso entre la flora del tracto genital, este hecho junto a la habilidad para transferirse inter-géneros y la presión ecológica creada por el uso de tetraciclinas para tratar otras ITS ha contribuido a la dispersión del fenotipo TRNG (Ison, 1996).

II.7.6. Combinación Sulfonamida-Trimetoprima

La combinación oral Sulfametoxazole-trimetoprima es usada en multidosis para el tratamiento de la gonorrea. Los dos agentes producen un bloqueo secuencial en la síntesis de tetrahidrolato el cual sirve como portador de grupos metilo. En la ausencia de tetrahidrolato, varias funciones esenciales como la conversión de uridina a timidina, y, por tanto, la síntesis de ADN, fracasan por lo que el microorganismo muere. La trimetoprima no es particularmente activa contra el gonococo y de hecho es usado como agente selectivo para el crecimiento de este microorganismo en placas de cultivo primario. Esto es debido a la poca afinidad de la dihidrolato reductasa del gonococo por la trimetoprima. Resistencia a las sulfonamidas pueden desarrollarse separadamente por varios mecanismos (Johnson y Morse, 1988). El gonococo, en contraste con muchos otros géneros no parece tener la habilidad de utilizar timina o timidina exógena y de este modo evitar el bloqueo de la síntesis de tetrahidrolato inducida por la combinación de la droga (Ho *et al.*, 1978).

II.7.7. Nuevos macrólidos

La resistencia a los primeros macrólidos como la eritromicina fue encontrada con la expresión del fenotipo *mtr* el cual también es responsable de la resistencia a la penicilina, tetraciclinas y ciertos colorantes y detergentes (Guymon y Sparling, 1975). Slaney *et al.* (1990) demostraron que la presencia del fenotipo *mtr* también incrementa las CIMs de la azitromicina. Las

posibilidades de cambios ribosomales como mecanismos de resistencia a la azitromicina se han valorado (Ehret *et al.*, 1996).

Se han reportado fracasos terapéuticos con regímenes bajos de la azitromicina (dosis de 1g) en la infección gonocócica no complicada (Steingrimsson *et al.*, 1990; Waugh, 1994; Tapsall *et al.*, 1998b). La factibilidad de aumentar las dosis de este agente para sobreponerse a tales fracasos del tratamiento no se ensaya debido a la alta frecuencia con que son observados efectos secundarios (Handsfield *et al.*, 1994).

II.8. Epidemiología de la diseminación de la resistencia en *N. gonorrhoeae*

Neisseria gonorrhoeae es un microorganismo patógeno no-clonal, altamente transformable, adepto a la adquisición de ADN desde microorganismos estrechamente relacionados que comparten su hábitat. Esta habilidad del gonococo para adquirir ADN y su condición intrínseca de alta variabilidad genética conllevan regularmente a cambios en el fenotipo y genotipo del microorganismo (O'Rourke y Spratt, 1994).

A pesar de la naturaleza no-clonal del gonococo, existen técnicas de caracterización y diferenciación de cepas con gran utilidad en estudios epidemiológicos de *N. gonorrhoeae*. Las más usadas se basan en múltiples características fenotípicas, siendo las más aceptadas la determinación del auxotipo y el serovar (A/S) (Sarafian y Knapp, 1989).

Carifo y Catlin (1973) establecieron que las cepas de *N. gonorrhoeae* pueden ser diferenciadas de acuerdo a requerimientos nutricionales específicos, teniendo en cuenta uno o más aminoácidos, bases nitrogenadas y vitaminas, siempre y cuando fueran cultivadas en un medio químicamente bien definido. De esta manera, las cepas "auxotróficas" pueden identificarse con alguna clase de auxotipo si no crecen en la ausencia de algunas de estas sustancias. El gonococo puede ser auxotrófico para varios componentes y todos requieren cisteína. Estudios posteriores demostraron que determinados auxotipos se correlacionan de manera estable con otras características de la cepa, o con determinadas formas clínicas de la enfermedad gonocócica (Hendry y Stewart, 1979), la asociación más familiar de auxotipos y enfermedad es aquella del AHU⁻ (arginina, hipoxantina y uracilo) y la enfermedad gonocócica diseminada (Li y Dillon, 1995). Los aislamientos que requieren arginina pueden ser subtipados por la misma técnica de auxotipos en citrulina-dependientes u ornitina dependientes (Catlin y Nash, 1973).

Los sistemas de clasificación serológica de *N. gonorrhoeae* han sido desarrollados sobre la base de la especificidad antigénica de la proteína I de membrana externa (PME-1) (Sandstrom *et al.*, 1982a). En un inicio Wang *et al.* (1977) utilizaron antisuero polivalente absorbido en una prueba de inmunofluorescencia y clasificaron a *N. gonorrhoeae* en tres serogrupos: A, B y C (Wang *et al.*, 1977). Sandstrom y Danielsson (1980) emplearon antisueros polivalentes en una prueba de co-aglutinación y dividieron los gonococos en tres grupos WI, WII y WIII. Estos serogrupos se correspondían con el A, B y C de Wang respectivamente. Más tarde Buchanan y Hildebrandt, (1981) desarrollaron un ensayo inmunoenzimático (ELISA) que permitió clasificar a *N. gonorrhoeae* en 9 serotipos: 1-3 se correspondían con serogrupo WI, 4-8 con serogrupo WII y 9 con serogrupo WIII. Algunos estudios de mapeo peptídico de la molécula de proteína I demostraron que las cepas WII y WIII poseían una PME-I muy similar, y fueron ambas denominadas IB, la cual fue diferente de la molécula de PME-I de las cepas WI, designada como IA (Sandstrom *et al.*, 1982b). La clasificación doble auxotipo/serogrupo fue usada durante algún tiempo pero con limitaciones. Por ejemplo, cepas pertenecientes al auxotipo/serogrupo Arginina-Hipoxantina-Uracilo/WI no podían ser distinguidas de otras cepas identificadas con este serogrupo (Tam *et al.*, 1982).

Finalmente, se desarrollaron anticuerpos monoclonales que permitieron identificar serovares en cepas de *N. gonorrhoeae* mediante el empleo de la técnica de co-aglutinación (Tam *et al.*, 1982; Knapp *et al.*, 1984). Con los anticuerpos monoclonales se obtuvieron reacciones más evidentes (más fuertes) y no se requirieron reacciones de adsorción tan extensas. Actualmente se dispone de dos paneles de anticuerpos monoclonales, seis anticuerpos monoclonales específicos de proteína IA (WI) y seis específicos de proteína IB (WII/III). Los patrones de reacción con cada panel de anticuerpos monoclonales permiten designar 18 y 28 serovares según las proteínas IA y IB respectivamente (Knapp *et al.*, 1984).

El auxotipo y el serovar son considerados los dos sistemas fenotípicos principales para la caracterización de *N. gonorrhoeae* y han resultado ser de gran utilidad en múltiples estudios en los que se ha establecido la correlación epidemiológica de la infección gonocócica y los patrones de resistencia antimicrobiana (Ison *et al.*, 1992 a).

Estos sistemas fenotípicos de caracterización han sido aplicados éxito en los estudios de población de cepas de gonococo, permitiendo detectar un incremento o disminución en la prevalencia o incidencia de determinadas cepas en estudios longitudinales. Alrededor de un 30-40% de los aislamientos están representados por una pequeña proporción de clases de A/S y persisten en áreas geográficas por algún tiempo. Una variedad mucho mayor de clases de A/S acontece para sólo un reducido número de aislamientos o aparecen de manera transitoria (Sarafian y Knapp, 1989).

La caracterización genética de las cepas de gonococo también se ha introducido mediante el uso de una variedad de técnicas. En general los métodos genéticos de alto poder de discriminación no son útiles en estudios longitudinales de *N. gonorrhoeae* debido al intercambio genético horizontal y recombinación de este microorganismo (O'Rourke y Spratt, 1994).

La estructura de población de *N. gonorrhoeae* es compleja y se han empleado técnicas que brindan una importante información sobre su variación genética; algunas de éstas técnicas tienen como base el empleo de las enzimas de restricción (O'Rourke y Estense, 1993). Un sistema genotípico aplicado muy a menudo en la tipificación de cepas resistentes a los antimicrobianos es la "electroforesis en gel de campo pulsado" (PFGE), aunque universalmente no hay uniformidad de la misma en cuanto a las endonucleasas empleadas, frecuencia de pulsos y los criterios de interpretación de los patrones de restricción obtenidos (Xia, 1995).

Sin embargo, ha sido posible seguir la huella de diseminación de ciertos tipos de gonococo, incluyendo aquellos que exhiben determinados patrones de resistencia antimicrobiana, utilizando la combinación de métodos genotípicos y clases de A/S (Tapsall, 2001).

La diseminación de cepas PPNG y TRNG puede ser monitoreada por el examen de los perfiles plasmídicos y el uso de otros marcadores previamente citados, la electroforesis en gel de campo pulsado y el ribotipaje (van Klingeren, 1985).

Los resultados de algunos estudios sugieren que hay etapas en la introducción de una cepa resistente a un antimicrobiano en la comunidad. Al principio se aíslan de forma esporádica múltiples subtipos con escasa o ninguna diseminación secundaria. Con la importación de nuevas cepas (desde localidades geográficas externas), casos de diseminación secundaria

pueden ocurrir hasta que se establece sostenidamente la transmisión local de cepas resistentes (Rothenberg y Voight, 1988).

La endemidad tiene lugar cuando hay una masa crítica de aislamientos resistentes, usualmente asociados con una alta frecuencia de transmisores dentro de un grupo principal de transmisión de la enfermedad como los trabajadores comerciales del sexo (Rothenberg y Voight, 1988). Si la cepa no se introduce en tales individuos, es improbable que la misma persista. Tal hipótesis es válida para la resistencia mediada por plasmidios y tiene su base en los datos y experiencias sobre la aparición de cepas PPNG en la Florida (Zenilman *et al.*, 1988).

Estudios realizados en Sydney, Australia, sugieren que tal patrón de diseminación propuesto por Rothenberg y Voight (1988) para la resistencia plasmídica puede ser aplicable a la emergencia y diseminación de gonococos con resistencia cromosomal a las quinolonas (QRNG) (Tapsall, 1998a).

CAPÍTULO III- MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Cepas Bacterianas

El universo y muestra del presente trabajo comprendió el total de cepas bacterianas viables identificadas presuntamente como *N. gonorrhoeae*, las cuales fueron aisladas entre enero de 1995 y febrero de 1998 y enviadas en el medio de transporte y conservación TCG (Martínez *et al.*, 1998) desde varias provincias de Cuba al Laboratorio Nacional de Referencia de Neisserias Patógenas (LNRNP) (Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”), Ciudad de la Habana. Las noventa y una cepas de estudio fueron recuperadas en 11 provincias de Cuba, a partir de exudados del tracto urogenital.

III.2. Identificación y conservación de las cepas

Para la identificación de las cepas se subcultivaron en el medio de agar chocolate base GC (BioCen) enriquecido con Isovitalex (Oxoid) al 1% (v/v). Las placas fueron incubadas entre 18 y 24 horas a 36°C, en atmósfera de 5% de CO₂ y posteriormente se realizaron las siguientes pruebas: coloración de Gram, prueba de Oxidasa por el método de Kovacs, prueba de superoxol (catalasa con peróxido de hidrógeno al 30%), así como la prueba de degradación de hidratos de carbono [base de agar CTA (Oxoid) con 1% de glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa y fructosa] (Knapp y Rice, 1995).

Las cepas fueron conservadas en caldo cerebro-corazón con glicerol (Reidel-de-Haën, Germany) al 20% (vol/vol) y almacenadas a -70°C. Finalmente las 91 cepas aisladas del tracto urogenital fueron liofilizadas, para ello se preparó una suspensión densa de células bacterianas en 2 mL de la solución de liofilización, la cual estuvo constituida por suero de caballo con inositol (SIGMA) al 1% (vol/vol); con pipeta de vidrio graduada de 1 mL se distribuyeron 0.2 mL de dicha suspensión en bulbos de 2 mL, se congelaron a -70°C y se llevó a cabo la liofilización de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Fisher Scientific, Nepean, Ont). Las cepas se trasladaron al laboratorio del Centro Coordinador del Programa de Vigilancia de Susceptibilidad Antimicrobiana de Gonococo para Américas y el Caribe (GASP) en la Universidad de Ottawa, Canadá, donde el autor concluyó el presente trabajo.

III.3. Determinación de la actividad β -lactamasa

Para la determinación presuntiva de la actividad beta-lactamasa, se empleó una solución de nitrocefín y se siguió el procedimiento de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Knapp, 1988); se depositó una gota de dicho reactivo en un papel de filtro, se tomaron varias colonias de *N. gonorrhoeae* con un asa de platino y se homogenizó la masa bacteriana en el sitio del papel embebido con dicha solución. Un cambio de color del amarillo al rojo en 5 minutos indicó un resultado positivo, mientras que un resultado negativo fue interpretado cuando no hubo cambio de color (permaneció amarillo).

Cepas control:

Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226 (negativa).

Neisseria gonorrhoeae M7-A2 (M100-S3)182 (positiva).

III.4. Susceptibilidad antimicrobiana

La técnica de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) se realizó según lo recomendado por el Comité Nacional para Normas de Laboratorio Clínico - NCCLS - (2000). Los antimicrobianos empleados fueron penicilina (Wyeth-Ayer St Canada Inc., St-Laurent, QC), tetraciclina (Pfizer Canada Inc., Pte Claire, QC), espectinomicina (Upjohn Co. Canada, Don Mills, ON), ceftriaxona (Hoffman-LaRoche, Mississauga, ON), ciprofloxacina (Bayer Inc., Etobicoke, ON) y azitromicina (Ayerst Laboratories, Montreal Canada). Los rangos de CIM sugeridos para determinar susceptibilidad, susceptibilidad intermedia y resistencia para cada antimicrobiano se muestran a continuación (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000).

Criterios de susceptibilidad por antimicrobianos:

<i>Antimicrobianos</i>	<i>CIM ($\mu\text{g/mL}$)</i>		
	<i>Susceptible</i>	<i>Intermedia</i>	<i>Resistente</i>
Penicilina	$\leq 0,06$	0,125-1	≥ 2
Espectinomicina	≤ 32	64	≥ 128
Tetraciclina	≤ 25	0,5-1	≥ 2
Ceftriaxona	$\leq 0,25$	ND	ND
Ciprofloxacina	$\leq 0,06$	0,125-0,5	≥ 1
Azitromicina*	$< 0,25$	0,25-1	≥ 2

* Zarantonelly *et al.*, 1999; ND= no determinado.

El método se desarrolló en duplicado realizando diluciones dobles de los antimicrobianos en agar base GC (Difco) enriquecido con suplemento definido de Kellogg a una concentración final de 1% (vol/vol), (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000).

Preparación del inóculo: A partir de un cultivo puro en agar base GC enriquecido con Kellogg al 1%, el cual fue incubado 18 horas en atmósfera de 5% de CO₂, se tomaron varias colonias bacterianas con asa plástica y se transfirieron a un tubo que contenía 5 mL de caldo Müeller-Hinton, ajustando la suspensión hasta alcanzar el valor próximo a las 10⁸ ufc/mL (comparada con el valor de 0,5 del patrón de turbidez de sulfato de bario de McFarland). Se diluyó esta suspensión 1:10 en caldo Müeller-Hinton para lograr una concentración aproximada de 10⁷ ufc/mL (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000).

Realización de la prueba: Se repartió igual cantidad (800 μL) de la suspensión bacteriana en cada pocillo del replicador. Este equipo carga un volumen de 0,001 a 0,005 mL (aproximadamente 10⁴ ufc/mL). El tiempo transcurrido entre la preparación de la suspensión bacteriana y la inoculación de las placas no excedió de 1 hora. Las placas se secaron durante 15 minutos aproximadamente a temperatura ambiente. Se inocularon las placas incluyendo cinco cepas controles, además de las cepas de estudio, en los pocillos No. 11, 12, 13, 14 y 15 del

replicador. Ésto se realizó con el objetivo de verificar la seguridad de la prueba (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000).

Cepas control:

WHOIII – *Neisseria gonorrhoeae*; WHOV- *Neisseria gonorrhoeae*; WHOVII- *Neisseria gonorrhoeae*; ATCC 49226- *Neisseria gonorrhoeae*; UO12- *Neisseria gonorrhoeae* –Universidad de Ottawa, Canadá.

La incubación se realizó durante 18-24 horas en atmósfera de 5% de CO₂ a 35°C. Además de las placas con diluciones para cada antimicrobiano se inoculó una placa sin antimicrobiano como control.

Cuando se realizó la lectura se comenzó por las placas sin antimicrobianos y se consideró válido el ensayo sólo si las cepas controles cumplían con los parámetros de susceptibilidad establecidos. Se consideró como valor de CIM la más baja concentración del agente antimicrobiano que inhibió completamente el crecimiento bacteriano, no considerando una sola colonia en el medio inoculado o una fina neblina causada por el inóculo. Si dos o más colonias persistieron más allá del punto final obvio o si no hubo crecimiento en las concentraciones más bajas pero sí en las más altas, la pureza del crecimiento se chequeó y el ensayo fue repetido (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000).

III.5. Extracción de ADN plasmídico

Para la extracción del ADN plasmídico se siguió el método descrito por Dillon y Pauze (1981) y utilizado por Pagotto *et al.*, (2000). Se cargó hasta un tercio de asa bacteriológica de 3 mm de diámetro con células de *N. gonorrhoeae*, las cuales habían crecido en medio agar base GC enriquecido con Kellogg, y se suspendió en 500 µL de solución tamponada STET (Sacarosa 8%, Tritón X-100, EDTA 50 mM, Tris-HCL 50 mM, pH 8); luego de homogeneizar dicha suspensión se adicionaron 100 µL de una solución de lisozima (10 mg/mL en STET), se mezcló en agitador y se dejó 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se colocó el tubo en baño de agua hirviendo por 45 segundos para desnaturalizar las nucleasas que pudieran estar presentes en el extracto. Inmediatamente se centrifugó a máxima velocidad (13 000 g)

(4°C); el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo microcentrífuga de 1,5 mL. El ADN fue purificado por la adición al sobrenadante de 500 µL de fenol saturado en Tris 0.1 M, pH 8 (BRL). Se mezcló bien por inversión manual del tubo y la fase acuosa se separó del fenol por centrifugación con las condiciones anteriormente descritas; se colectó y trasladó la fase acuosa a un tubo microcentrífuga de 1,5 mL limpio y el ADN plasmídico se precipitó por la adición de 200 µL de acetato de amonio (5 M) seguido por 1 mL de etanol 95% frío. Se expuso 10-20 minutos a -70 °C y el sedimento obtenido por centrifugación a 13 000 g, luego de descartar el etanol, se secó al aire en incubadora a 37 °C y se resuspendió en 25 µL de Tris-EDTA (Tris 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8) (Dillon y Pauze, 1981).

Para visualizar el ADN plasmídico se realizó la electroforesis en una cámara submarina (HOEFER Scientific Instruments) usando un portagel de 20 por 25 cm. Como fuente de voltaje se usó un equipo BioRad modelo 200/2.0. La agarosa (ADN/ARN, LKB 2206-105) se preparó al 0,8% en tampón Tris-acetato pH 8 (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M) con bromuro de etidio al 5%, el cual se usó también como solución de corrida para la Electroforesis. De cada muestra se aplicaron 25 µL por pocillo y la corrida se efectuó a 50 Voltios durante 3 horas. Se emplearon como control las cepas:

C3- *Neisseria gonorrhoeae* – Libre de plasmidios – LCDC, Canadá.

GC- 182 – *Neisseria gonorrhoeae* (2,6; 4,5; 24,5; MDa) – LCDC, Canadá.

Neisseria gonorrhoeae 13555 (2,6; 24,5 MDa) (colección Jo-Anne R. Dillon, Universidad de Ottawa).

Neisseria gonorrhoeae 13517 (2,6; 3,05; 24,5 MDa) – (colección Jo-Anne R. Dillon, Universidad de Ottawa).

GC- 3976 *Neisseria gonorrhoeae* (2,6; 3,2; 25,2 MDa) – LCDC, Canadá

Neisseria gonorrhoeae 13 541(2,6; 3,2; 24.5 MDa) (colección Jo-Anne R. Dillon, Universidad de Ottawa).

Neisseria gonorrhoeae 13858 (2,6; 25,2 MDa) (colección Jo-Anne R. Dillon, Universidad de Ottawa).

Definición de términos

Cepa PPNG: cepa con CIM < 16 para la tetraciclina y productora de β -lactamasa.

Cepa TRNG: cepa con CIM ≥ 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la tetraciclina y no productora de β -lactamasa.

Cepa PP/TRNG: cepa productora de β -lactamasa y con CIM ≥ 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la tetraciclina.

Cepa No-PP/No-TRNG: cepa no productora de penicilinas y con CIM menor de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la tetraciclina, incluyendo cepas susceptibles, resistentes con CIM ≥ 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la penicilina y/o tetraciclina (por ejemplo, CMPR para la penicilina y CMTR para la tetraciclina) y cepas con resistencia cromosomal a la penicilina y la tetraciclina (CMRNG).

Multirresistencia: resistencia de una cepa a dos o más agentes antimicrobianos.

III.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa del determinante *tet-M*

La RCP para identificar el determinante *tet-M* se llevó a cabo en las cepas que exhibieron CIM mayor o igual a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la tetraciclina y fue realizada según el protocolo descrito por Xia (1995). Se utilizaron los cebadores RM4- 5' CCAAATCCTT^{*}TCTGGGCT 3' y G1- 5' ATCACTCACAGT^{*}TAAT^{*}TTT 3'. Se preparó una mezcla para 100 μL de reacción de amplificación que contenía 50 pmol de cada cebador oligonucleótido (RM4 y G1), 200 μM de cada uno de los dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), tampón de la RCP (10mM Tris-HCL pH 8.3, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de albúmina de suero bovino, 50 mM KCL, MgCl_2 1,5 mM) y 0,5 U de *Taq* ADN polimerasa (5 U/ μL). Se utilizaron reactivos de la Boehringer Mannheim Biochemicals (BMC, Dorval, Québec) para todas las amplificaciones. Además, se laboró en gabinete libre de ADN; el template de ADN se adicionó fuera de esta área.

Las células de *N. gonorrhoeae* procedentes de un cultivo de 18 horas se suspendieron en 2 mL de agua bidestilada estéril a la concentración equivalente del patrón 0,5 McFarland (aproximadamente 1×10^8 ufc/mL). Se mantuvo la suspensión de células a temperatura ambiente al menos 30 minutos con lo cual se logró la lisis celular.

En el área destinada para la adición del ADN en la reacción de PCR, se procedió a la adición de 10 μL de la muestra celular con lisis a su respectivo tubo de reacción. El termo-ciclador (Perking-Elmer Cetus) se ajustó para 94°C por 3 minutos; 30 ciclos de la siguiente manera: desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 44°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 3 minutos y un ciclo final con una prolongada extensión de 5 minutos a 72°C.

El producto de ADN amplificado se analizó por electroforesis de 10 µL en un gel de agarosa al 1%. Se empleó un marcador de peso molecular de 1 kilobase en cada gel y la coloración del gel se llevó a cabo en una solución de bromuro de etidio (10 µg/mL) durante 3 minutos. La visualización y fotografía se realizó bajo iluminación de luz ultravioleta (Sambrook *et al.*, 1989). La talla esperada del amplicón *tet-M* fue de 700 pb para el tipo Holandés (Dutch) y de 1 600 pb el tipo Americano.

Cepas controles:

Neisseria gonorrhoeae 64 18 (control positivo tipo Americano) – colección Jo- Anne R. Dillon (Universidad de Ottawa).

Neisseria gonorrhoeae 2903 (control positivo tipo Holandés) – colección Jo- Anne R. Dillon (Universidad de Ottawa).

III.7. Determinación del auxotipo

Los requerimientos nutritivos para el crecimiento en *N. gonorrhoeae* fueron determinados por el método de Hendry y Stewart (1979) según modificaciones de Picard y Dillon (1989). El protocolo contó de los siguientes pasos.

I – Preparación de soluciones y “mezclas” de aminoácidos (ver en anexo): Todas las soluciones fueron almacenadas en congelación (– 20°C) hasta su uso (ver anexo).

II- Preparación de solución de sales: Las proporciones se observan en anexo.

III- Preparación de otras tras soluciones (ver anexo).

IV- Diluyente: El diluyente fue usado para suspender el crecimiento bacteriano previo a la inoculación del medio (ver anexo).

V- Preparación del medio líquido base a doble concentración: La siguiente fórmula fue suficiente para preparar 1 litro del medio líquido base a doble concentración (ver nexos).

Una serie de 10 beakers fueron marcados con los siguientes símbolos: POS (control positivo), NEG (control negativo), P-, C-, CO-, M-, U-, H-, L- (prolina, citrulina, ornitina, metionina, uracilo e hipoxantina “dependientes” respectivamente) y Fe⁺ (para placas de sensibilidad a

fenilalanina). Se adicionaron 100 mL del medio líquido base con doble concentración a cada uno de los 10 beakers marcados. Posteriormente se adicionaron las soluciones que se muestran a continuación evitando verter cada una de ellas en el beaker marcado con el símbolo de su nombre, como por ejemplo:

Mezcla # 1 de aminoácidos	0,5 mL	A todos los recipientes Excepto NEG
L- citrulina	0,5 mL	A todos los recipientes excepto C ⁻ , CO ⁻
L- ornitina	0,5 mL	A todos los recipientes excepto CO ⁻
L- prolina	0,5 mL	A todos los recipientes excepto P ⁻
L- metionina	0,5 mL	A todos los recipientes excepto M ⁻
Uracilo	0,5 mL	A todos los recipientes excepto U ⁻
Hipoxantina	0,5 mL	A todos los recipientes excepto H ⁻
L- leucina	0,5 mL	A todos los recipientes excepto L ⁻
Mezcla #5	1,0 mL	A todos los recipientes excepto Fen ⁺
Fenilalanina	0,5 mL	Solamente a Fen ⁺

Las soluciones finales contenidas en cada beaker fueron esterizadas por filtración (unidades de filtros de 0,2 µm) (Nalgene).

VI- Preparación del agar a doble concentración: Se adicionaron 2,5 gramos de agar a 100 mL de agua bidestilada estéril contenida en un frasco de 250 mL. Seguidamente se esterilizó en

autoclave a 15 lb/pulgada² durante 15 minutos. Previo a su uso se calentó a 50°C en baño de agua.

VII- Preparación del medio de auxotipo: Se marcaron 10 placas (100x15 mm) con cada uno de los siguientes símbolos: POS, NEG, P-, C-, CO-, M-, U- y H-. Se prepararon 8 frascos conteniendo 100 mL de agar a doble concentración y se mantuvieron a 50°C. El medio líquido básico con doble concentración se mantuvo también a 50°C por un tiempo no mayor de 15 minutos. Asépticamente, se adicionaron 100 mL del medio líquido básico de doble concentración a 100 mL del agar a doble concentración y se mezcló por rotación manual.

Finalmente se distribuyó la mezcla definitiva de medio para auxotipo en cada placa, de acuerdo al rótulo, y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Después de 24 horas, las placas fueron recogidas y almacenadas a 4°C hasta su empleo en la prueba.

VIII- Preparación del inóculo: Según lo especificado para la determinación de CIM pero se empleó el diluyente de auxotipos para hacer la suspensión de trabajo.

Las placas se acondicionaron a temperatura ambiente antes de ser inoculadas y fueron inoculadas con replicador de "Steers", según lo indicado para la determinación de CIM. La incubación se realizó durante 48 horas a 35°C en atmósfera de 5% de CO₂ y la lectura se realizó a las 24 y 48 horas.

Se emplearon las siguientes cepas controles (LCDC, Canadá): C1 (O-), C2 (prototrófica), C3 (PCU-), C4 (PM-), C5 (CUH-) y c6 (OUH-), las cuales fueron ubicadas en los posillos 11,12,13,14,15 y 16.

IX- Interpretación de los resultados:

- Todas las cepas deben crecer en el medio control positivo.
- Los aislamientos que no son gonococos crecerán en el medio control negativo.
- Debe anotarse para cada aislamiento el medio en que no fue capaz de crecer. Por ejemplo un aislamiento que no creció en el medio carente de prolina es deficiente en la síntesis de

este aminoácido y su auxotipo será simbolizado con la letra inicial como P.

- La aparición de pocas colonias o ninguna después de las 48 horas de incubación es generalmente registrado como negativo para el crecimiento. Zonas de crecimiento como neblina o muy fino en el sitio inicial del inóculo son consideradas también como negativos,
- Como el gonococo no crece en medios deficientes en cistina y cisteína, cualquier colonia que crezca en el medio control negativo es considerada un contaminante, En tal caso fueron confirmadas con pruebas bioquímicas,

III.8. Clasificación serológica (serogrupos y serovares)

Los serovares fueron determinados en los 91 aislamientos siguiendo la metodología descrita por Tam *et al.*, (1982) y Knapp *et al.*, (1984).

I- Preparación de las suspensiones:

Se prepararon suspensiones con subcultivos de 18 horas de crecimiento en agar base GC enriquecido con suplemento definido de Kellogg. Éstas se realizaron en tubos de 13 mm que contenían 1,5 mL solución tampón 0,15 M (pH 7,2). Para ello se suspendió aproximadamente 1/3 de asa de crecimiento fresco de células en la solución tamponada y se agitó vigorosamente hasta lograr una suspensión homogénea. Se ajustó al patrón de turbidez 3 de McFarland. Inmediatamente las suspensiones se calentaron en baño de agua con ligera ebullición durante 10 minutos y se permitió que éstas alcanzaran la temperatura ambiente para el ensayo de coaglutinación.

II- Ensayo serológico

Se emplearon los siguientes paneles de anticuerpos monoclonales (Syva, Palo Alto, California, USA):

Panel IA (WI): 4 A12, 4 G5, 2 F12, 6 D9, 5G9, 5D1

Panel IB (WII/III): 3 C8, 1 F5, 2 D6, 2 G2, 2 D4, 2 H1

Para la co-aglutinación los anticuerpos monoclonales se absorbieron a proteína A de células de *Staphylococcus aureus* (Pansorbin^R, Calbiochem^R).

Con una pipeta Pasteur se aplicó una gota de cada anticuerpo monoclonal a uno de los seis pocillos de una placa de neutralización con fondo plano y claro, seguidamente se adicionó una gota de la suspensión bacteriana, se colocó la placa en una lámina rotatoria (33 rpm aproximadamente) durante 2 minutos, Las reacciones fueron leídas inmediatamente utilizando una luz oblicua y fondo de color negro opaco.

III- Criterios de interpretación

4+: grumos muy grandes, a menudo alrededor de la gota de reacción; se observa un fondo claro.

3+: grandes grumos distribuidos a través de la gota de la reacción; se observa un fondo claro.

2+: grumos definidos, finos a menudo; se observa un fondo turbio no muy claro.

1+: grumos ligeros, fondo blanquecino, lechoso, Esta reacción es interpretada como negativa.

- : no evidencia de grumos, gota de reacción de aspecto francamente lechoso.

El tipo de serovar fue determinado según el patrón de reacción observado con cada panel de anticuerpos monoclonales. Cuando fueran observados patrones que no coincidieran con los definidos en el diagrama de comparación, se consideraría la posibilidad de que el cultivo con el que se preparó la suspensión estuviera mezclado con otro microorganismo o que estábamos en presencia de nuevos serovares. En el primer caso se procedió a reaislar y tomar una sola colonia y se repitió la prueba.

Cepas controles: Suministradas por Jo-Anne R, Dillon, Universidad de Ottawa, Canadá.

Cepa de referencia de *N. gonorrhoeae* C5 (IA-2).

Cepa de referencia de *N. gonorrhoeae* 159 (IA-4).

Cepa de referencia de *N. gonorrhoeae* G7 (IA-5).

Cepa de referencia de *N. gonorrhoeae* D4 (IA-6).

Cepa de referencia de *N. gonorrhoeae* NRL9718 (IA-6).

Cepa de referencia de *N. gonorrhoeae* W16 (IA-15).

- Cepa de referencia de *N. gonorrhoeae* H8 (IB-1).
- Cepa de referencia de *N. gonorrhoeae* C3 (IB-2).
- Cepa de referencia de *N. gonorrhoeae* S12 (IB-3).
- Cepa de referencia de *N. gonorrhoeae* F6(IB-4).
- Cepa de referencia de *N. gonorrhoeae* F62 (IB-7).
- Cepa de referencia de *N. gonorrhoeae* 182 (IB-7).
- Cepa de referencia de *N. gonorrhoeae* T13 (IB-22).

III.9. Electroforesis de ADN en gel de campo pulsado (PFGE)

Los aislamientos de *N. gonorrhoeae* constituyentes de grupos principales o fenotipos mayores (según la distribución de clases A/S y perfil plasmídico) detectados entre el total de las cepas de estudio fueron adicionalmente analizados por PFGE como ha sido descrito previamente (Chang y Taylor, 1990; Ng y Dillon, 1993):

III.9.1. Preparación del ADN cromosomal y digestión con endonucleasas de restricción.

Se utilizó el siguiente protocolo (Ng y Dillon, 1993). Un cultivo de 16 horas de *N. gonorrhoeae* fue suspendido en tampón TE (Tris 50 mM, EDTA 5 mM pH 7,8) a una densidad correspondiente con una concentración de $1,5 \times 10^9$ bacterias/mL). Se transfirieron 100 μ L de dicha suspensión celular a 1 mL de una solución de agarosa de bajo punto de fusión (GIBCO, BRL) en agua bidestilada estéril al 1% y se mezcló vigorosamente. Con esta mezcla se llenaron ranuras de un molde plástico que nos permitió obtener bloques de gel al solidificar a la temperatura de 4°C. Los bloques de agarosa se introdujeron en tubos que contenían 1 mL de la solución tamponada ESP pH 9 (EDTA 0,25 M- pH 9; Lauroyl Sarcosine, SIGMA 0,5%; proteinasa K, SIGMA 0,5 mg/mL) y se incubaron a 50°C por 24 horas. Al final de este paso los bloques de agarosa-ADN pudieron ser almacenados a 4°C hasta el siguiente procedimiento.

Cada bloque de agarosa-ADN es cortado entonces en pequeñas barras de alrededor de 1 mm, cinco barras por cepa son transferidas a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y lavados tres veces durante 15 minutos con 1 mL de solución tamponada TE con fluoruro fenil-metil-sulfonilo (PMSF) (PMSF, SIGMA; alcohol isopropílico, 0,1 M) a una concentración final de 1

mM. Posteriormente, se llevaron a cabo tres lavados más de 15 minutos cada uno con TE (sin PMSF). Las pequeñas barras de agarosa-ADN fueron almacenadas en solución tamponada TE (Tris 50mM, EDTA 5 mM) a 4°C hasta la digestión con endonucleasas de restricción.

Se descartó la solución TE y las barras de agarosa-ADN fueron equilibradas con 100 µL de la solución tamponada (New England BioLabs) de la enzima de restricción a usar (*NbeI* y *SpeI*) a temperatura ambiente durante 4 horas.

La digestión se realizó con las enzimas *NbeI* y *SpeI* (New England BioLabs) a 37°C por 24 horas en un volumen final de 100 µL de la solución tamponada de cada enzima de restricción (*NbeI* y *SpeI*), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Después de la digestión se lavaron las barras de agarosa-ADN con la solución TE y se ubicaron en la ranura o pozo del gel de corrida (agarosa para PFGE, SIGMA, al 1% en la solución tampón TBE (Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM; pH 8,3). Finalmente la ranura o pozo del gel fue sellada con la solución de agarosa al 1% y se efectuó la corrida electroforética.

III.9.2. Electroforesis y visualización del ADN

La electroforesis fue llevada a cabo en un sistema de campo eléctrico (CHEF-DRII; BioRad, Ontario), aplicando 5 voltios/cm², con el tampón de corrida a la temperatura de 14°C. El tiempo de las pulsaciones fue incrementado para la enzima *NbeI* desde 1 a 50 segundos durante las primeras 13 horas y desde 2 a 50 segundos en las 10 horas siguientes; para la enzima *SpeI* el incremento del tiempo fue desde 0,2 hasta 54,2 segundos en un sólo programa de 24 horas.

Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (SIGMA) a 10 µg/mL durante 5 minutos, lavados con agua bidestilada estéril y la fotografía se realizó bajo iluminación ultravioleta con un sistema de imagen digital Bio Photonics Gel Print 2000i (BIO/CAN Scientific; Mississauga, Ontario). El fago Lambda Ladders fue usado como marcador de peso molecular (BioRad, Ontario).

Nosotros tuvimos en cuenta que nuestras cepas de estudio fueron colectadas en áreas distantes entre sí y durante un período de 4 años; con el fin de incrementar las posibilidades de discriminación en el análisis de los patrones de PFGE decidimos utilizar dos enzimas de restricción (*NbeI* y *SpeI*). Aislamientos con idénticas combinaciones de patrones de

macrorrestricción se agruparon en un cluster. Un solo evento genético es responsable de hasta tres diferencias en los patrones de restricción obtenidos por el método de electroforesis en gel de campo pulsado, y de haber ocurrido aislamientos con tres o menos bandas de diferencia se considerarían subtipos de la misma cepa y, por consiguiente, estrechamente relacionados a los aislamientos del cluster prototipo, mientras que cepas con más de tres bandas de diferencias fueron consideradas como no relacionadas (Goering, 1993; Tenover *et al.*, 1995).

III.10. Análisis estadístico

Los datos fueron recogidos en una base de datos de Microsoft Excel y se mostraron los porcentajes de las características de interés en tablas de contingencia; en un caso específico de evaluación de la asociación significativa del determinante *tet-M* Holandés o Americano a determinado perfil plasmídico, se usó el Test exacto de Fisher. Se realizó un análisis de correlación lineal entre valores logarítmicos de las CIMs obtenidas en las cepas de estudio frente a la tetraciclina y la azitromicina [Coeficiente de Pearson, r], mediante el programa estadístico EPINFO.

CAPÍTULO IV- RESULTADOS

IV.1. Distribución de aislamientos de *N. gonorrhoeae* por provincias y años.

En la tabla 1 se observa una disminución continua del número de aislamientos viables desde el año 1995 hasta 1998, siendo Ciudad de la Habana la provincia que aportó el mayor número de cepas de *N. gonorrhoeae* viables por cada año.

IV.2. Susceptibilidad antimicrobiana.

Los resultados del estudio de la susceptibilidad a la penicilina, tetraciclina, espectinomicina, ciprofloxacina, ceftriaxona y azitromicina de 91 aislamientos de *N. gonorrhoeae*, recuperados en 11 provincias de Cuba, se encuentran resumidos en la Tabla 2. Sesenta y dos aislamientos (68,1%) mostraron resistencia a la penicilina ($\text{CIM} \geq 2 \mu\text{g/ml}$, Tabla 2), 27 (29,7 %) susceptibilidad intermedia ($\text{CIM } 0.12\text{-}1 \text{ mg/mL}$, Tabla 2) y 2 (2,2 %) fueron susceptibles ($\text{CIM} \leq 0,06 \mu\text{g/mL}$, Tabla 2). Con respecto a la susceptibilidad a la tetraciclina 76 (83,5%) cepas fueron resistentes ($\text{CIM} \geq 2 \mu\text{g/mL}$, Tabla 2), mientras que 15 (16,5) se comportaron con susceptibilidad disminuida ($\text{CIM } 0.25\text{-}1 \mu\text{g/mL}$, Tabla 2) y ninguna cepa resultó susceptible. El 100% de las cepas mostraron susceptibilidad a la espectinomicina, ciprofloxacina y la ceftriaxona (Tabla 2). Para la espectinomicina se observaron valores de CIM_{50} y CIM_{90} de 8 $\mu\text{g/mL}$ y 16 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente; mientras que los valores de CIM_{90} de las drogas ciprofloxacina y ceftriaxona fueron de 0,016 y 0,032 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Tabla 2). Sin embargo, 5 cepas fueron resistentes a la azitromicina ($\text{CIM} \geq 2 \mu\text{g/mL}$, Tabla 2) y 49 aislamientos tuvieron susceptibilidad disminuida a esta droga ($\text{CIM } 0,25\text{-}1.0 \mu\text{g/mL}$, Tabla 2). De estos 49 aislamientos, 23 tuvieron también resistencia mediada por cromosoma o susceptibilidad disminuida a la penicilina y la tetraciclina, mientras 24 portaron resistencia plasmídica y dos fueron susceptibles a la penicilina (datos no mostrados). De los 62 aislamientos resistentes a la penicilina en 51 (56%) de ellos se confirmó la producción de β -lactamasa (PPNG): 45 PP/TRNG, 5 PPNG/CMTR (Tabla 3), y uno tuvo susceptibilidad disminuida a la tetraciclina ($\text{CIM } 1 \mu\text{g/mL}$, Tabla 4). Las 11 cepas restantes (12%) con resistencia a la penicilina fueron no-PP/TRNG, siendo consideradas por el valor de sus CIMs como cepas con resistencia cromosomal a la penicilina (10 CMRNG y 1 CMPR, Tabla 3).

Un total de 58 cepas (63,7%) fueron TRNG (45 PP/TRNG y 13 TRNG, Tabla 3) y 18 (19,8%) tuvieron resistencia mediada por cromosoma a la tetraciclina con CIMs ≥ 2 hasta 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 2). Diez de estos últimos aislamientos mostraron también resistencia cromosomal a la penicilina (por ejemplo CMRNG, Tabla 3) y 5 fueron productores de penicilinasas (por ejemplo PPNG, Tabla 3).

De las 91 cepas 27 fueron no-PP/TRNG, pero solamente 13 de ellas (14,3%) fueron susceptibles a ambos antibióticos (Tabla 3); en estos 27 aislamientos no se encontró una correlación significativa entre las CIMs para la tetraciclina y azitromicina ($r = 0,17636891$, $P = 0,38$). Todas las cepas resistentes a la azitromicina fueron TRNG (4 PP/TRNG y 1 TRNG) (datos no mostrados).

El fenómeno de multirresistencia se observó en el 67% (61/91) de los aislamientos. De las 91 cepas, 56 (61,5%) mostraron resistencia combinada a la penicilina y tetraciclina, 4 cepas (4,4%) a la penicilina, tetraciclina y azitromicina y 1 (1,1%) cepa tuvo alto nivel de resistencia a la tetraciclina y resistencia a la azitromicina (Tabla 5).

IV.3. Perfil plasmídico

Según los datos mostrados en la tabla 6, se hallaron seis perfiles plasmídicos entre las 91 cepas, siendo el 2,6-3,2-25,2 MDa el más frecuente (45 aislamientos) y el único encontrado entre las PP/TRNG. El perfil plasmídico que predominó entre las cepas no-PPNG/no-TRNG fue el de 2,6-24,5 MDa, seguido del de 2,6 MDa y observados en 15 y 10 aislamientos, respectivamente. En las cepas PPNG se encontraron 3 cepas con el perfil 2,6-3,2 y 3 cepas con el perfil 2,6-4,5-24,5. En dos aislamientos no fue posible identificar ninguna clase de plasmidios. El plasmidio de 3,2 MDa (Africano) se observó en 48 (3 con el perfil 2,6-3,2 MDa y 45 con el perfil 2,6-3,2-25,2 MDa) (Tabla 6).

IV.4. Determinante *tet-M* y perfil plasmídico

La figura 1 muestra los productos de amplificación correspondientes a la secuencia blanco en el determinante *tet-M* en algunos de los aislamientos estudiados. En 48 aislamientos con alto nivel de resistencia a la tetraciclina (52,7%) se obtuvo una banda de aproximadamente 1 600 pb, correspondiente al determinante *tet-M* tipo Americano y en los restantes 10 aislamientos TRNG (10,9%) se constató una banda de una talla molecular alrededor de los 700 pb (determinante tipo Holandés). Cuarenta y cuatro (48,4%) cepas con el tipo Americano también contenían el plasmidio que codifica para la producción de β -lactamasa de 3,2 MDa (por ejemplo fueron PP/TRNG), observándose una asociación significativa (Test exacto de Fisher, significación $p < 0,0001$) del determinante tipo Americano con el perfil plasmídico 2,6-3,2-25,2 y del tipo Holandés con el perfil 2,6-25,2 (Tabla 7).

IV.5. Auxotipos

La Tabla 8 resume la distribución de los auxotipos determinados en 91 cepas de estudio. Alrededor del 99% de las cepas pertenecieron a alguno de los siete auxotipos identificados: prototrófico, Prolina-, Citrulina-Uracilo-, Ornitina-, Hipoxantina-, Prolina-Ornitina- y Metionina-. El 70,3% de los aislamientos pertenecieron al tipo prototrófico (proto). El 15,4%, 5,5% y 3,3 % fueron dependientes de la Prolina (P-), Citrulina-Uracilo (CU-), y Ornitina (O-), respectivamente. Estos cuatro auxotipos se hallaron en el 94,5% de las 91 cepas estudiadas. En una cepa el auxotipo no pudo ser determinado (ND).

IV.6. Serogrupo y Serovares

En los 91 aislamientos, 10 serovares fueron identificados. De éstos, 63,7 % se identificaron con la proteína IA (serogrupo WI) y el 36,3% con la proteína IB (serogrupo WII/III). El serovar IA-6 fue el más frecuente (53,8%), mientras que el IB-1, IB-3 y IA-3 estuvieron presentes en el 19,8%, 9,9% y 4,4% de las cepas, respectivamente. La proporción de hallazgo de otros serovares fue mucho más baja (Tabla 9).

IV.7. Auxotipos, Serovares

La combinación de ambos sistemas de clasificación, Auxotipo/Serovar (A/S), permitió identificar 21 clases de A/S en las 91 cepas (Tabla 10); 61(67%) pertenecieron a tres clases mayores de A/S, la proto/IA-6, representada en el 71,1% de los aislamientos PP/TRNG; la clase P-/IA-6 en el 61,5% de los aislamientos TRNG y la clase proto/IB-1 en el 40,7% de los aislamientos No-PP/TRNG (datos no mostrados).

Un 35,2% (32 aislamientos) de las 91 cepas fueron PP/TRNG, de la clase A/S proto/IA-6 (Tabla 10) y contenían el mismo perfil plasmídico (2,6-3,2-25,2 MDa con el determinante *tet-M* tipo Americano, Tabla 3). La mayoría de estos aislamientos pertenecieron a Ciudad de la Habana y se encontraron en todos los años de estudio (1995-1998). Once aislamientos (12%) no- PPNG/no- TRNG, pertenecieron a la clase A/S proto/IB-1 (Tabla 10), y cinco de ellos fueron aislados en la provincia de Santiago de Cuba, entre 1995 y 1996. Diez de estos aislamientos portaron el perfil plasmídico de 2,6-24,5 MDa y uno solamente el de 2,6 MDa (datos no mostrados). Siete aislamientos TRNG (7,7%) de la clase P-/IA-6 mostraron el perfil plasmídico de 2,6-25,2 MDa y el tipo *tet-M* Holandés (Tabla 3, Tabla 10); un total de 5 de los 7 aislamientos procedían de Ciudad de la Habana.

Así, podemos concluir que se identificaron tres fenotipos mayores en las categorías de susceptibilidad antimicrobiana PP/TRNG, TRNG y No-PP/TRNG. Treinta y dos de las 45 cepas PP/TRNG del presente trabajo pertenecieron a la clase A/S proto/IA-6, exhibieron el perfil plasmídico 2,6-3,2-25,2 MDa y portaron el determinante *tet-M* tipo Americano (Tabla 3 y 11) (**fenotipo I**). Mientras que en las cepas TRNG, 7 de 13 cepas tuvieron el fenotipo: P-/IA-6, el perfil plasmídico 2,6-25,2 MDa y el determinante *tet-M* tipo Holandés (Tabla 3) (**fenotipo II**). Un tercer fenotipo (**fenotipo III**) fue identificado y estuvo compuesto de 9 aislamientos No-PP/TRNG, proto/IB-1 y con el perfil plasmídico 2,6-24,5.

De manera interesante, los 15 aislamientos Proto/IB-1 (Tabla 3) tuvieron susceptibilidad disminuida a la azitromicina (CIM 0,25-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Tabla 2); 11 de estas cepas fueron cromosomalmente resistentes a la penicilina y la tetraciclina, mientras que tres fueron PPNG y tuvieron resistencia cromosomal a la tetraciclina, y una fue TRNG (datos no mostrados).

IV.8. Electroforesis en gel de campo pulsado

Con el análisis de la combinación de patrones de PFGE con ambas enzimas en 52 aislamientos pertenecientes a las tres clases mayores de A/S se observaron 11 - 17 y 10 - 15 fragmentos de macrorrestricción con cada enzima *NbeI* y *SpeI*, respectivamente (Figura 2 y 3). Tales fragmentos fueron resueltos en 16 patrones para la enzima *NbeI* (Figura 2) y 8 patrones para la enzima *SpeI* (Figura 3). Con el análisis de los patrones de ambas enzimas por cada cepa se describieron 18 combinaciones de patrones PFGE *NbeI/SpeI* (Tabla 11).

Se identificaron cuatro "clusters" principales. Diecisiete aislamientos proto/IA-6 (27,9%) tuvieron el mismo patrón con ambas enzimas y fueron considerados el prototipo I (**cluster I**) (Tabla 11). Estos aislamientos fueron recuperados principalmente de las muestras de Ciudad de la Habana y durante 1995-1997. En siete aislamientos analizados de la clase A/S P-/IA-6, tres (4,9%) tuvieron el patrón *NbeI/SpeI* X (**cluster II**), 3 (4,9) el XI (**cluster III**) y 1 el patrón XII (Tabla 11). Finalmente, en el grupo Proto/IB-1, en 11 cepas estudiadas se encontraron cinco aislamientos (5,5%) con el mismo patrón de PFGE *NbeI/SpeI* XIII (**cluster IV**). Cuatro de estos aislamientos procedían de muestras de la provincia de Santiago de Cuba durante 1995, mientras que el quinto aislamiento procedía de la provincia Habana (Municipio San Antonio de los Baños) y había sido aislado en el año 1998.

IV.9. Tablas

Tabla 1. Distribución de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas del tracto urogenital por provincia y año.

Ciudad	Años				Total
	1995	1996	1997	1998	
Pinar del Río	3	1			4
Ciudad de la Habana	22	12	10	1	45
Habana	6			1	7
Villa Clara			2		2
Cienfuegos	2				2
Sancti Spíritus	2				2
Camagüey	10			1	11
Holguín			1		1
Granma	1				1
Santiago de Cuba	5	8			13
Guantánamo			2	1	3
Total	51	21	15	4	91

Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia de Neisserias Patógenas.

Tabla 1. Susceptibilidad antimicrobiana de 91 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas en Cuba (1995-1998).

Drogas	Número de aislamientos / % acumulativo / CIM ($\mu\text{g/mL}$)																		
	0,001	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	> 128
Pen ^a							2/2,2	1/3,3	4/7,7	15/24,2	7/31,9	4/36,3	6/42,9	1/44,0	4/48,4	3/51,6	5/57,1	18/76,9	21/100
Tet											15/16,5	7/24,2	8/33,0	3/36,3	14/51,6	42/97,8	2/100		
Espec														34/37,4	57/100				
Ceft	1/1,1	7/8,8	44/57,1	18/76,9	7/84,6	6/91,2	8/100												
Cipro			43/47,3	28/78,0	12/91,2	4/95,6	4/100												
Azit						1/1,1	17/19,8	19/40,7	26/69,2	19/90,1	4/94,5		5/100						

a) Pen = penicilina; Tet = tetraciclina; Espec = espectinomicina; Ceft = ceftriaxona; Cipro = ciprofloxacina; Azit = azitromicina

Tabla 3. Susceptibilidad a la penicilina y/o tetraciclina en 91 aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* de diferentes Clases de Auxotipo/Serovar.

Clases de A/S ^a	Clases de Susceptibilidad No. (% del total)							Total
	PP/TRNG ^b	TRNG	PPNG	NO-PP/TRNG				
				CMTR	CMPR	CMRNG	Susc	
proto/IA-6	32(35,2)	3(3,3)	0	0	0	0	0	35(38,5)
proto/IB-1	1(1,1)	0	3(3,3)	1(1,1)	0	8(80)	2	15(16,5)
P/IA-6	1(1,1)	8(8,8) ^c	2(2,2)	0	0	0	0	11(12,1)
Proto/IA-3	4(4,4)	0	0	0	0	0	0	4(4,4)
Otros (17) ^d	7(7,7)	2(2,2)	1(1,1)	2(2,2)	1(1,1)	2(2,2)	11(12,1)	26(28,6)
Total	45(49,5)	13(14,3)	6(6,6) ^e	3(3,3)	1(1,1)	10(11)	13(14,3)	91(100)

a) proto = prototrófica o tipo salvaje, P = prolina-dependiente, C = citrulina-dependiente, U = uracilo-dependiente; b) todas las PP/TRNG portaron el perfil plasmídico plásmido 2,6-3,2-25,2 MDA y el tipo de determinante tet-M Americano; c) todos los aislamientos TRNG contienen el perfil plasmídico 2,6-25,2 Mda, siete con el determinante *tet-M* tipo Holandés y uno con el tipo Americano d) proto/IA-8=2, proto/IA-21=1, proto/IB-2=3, ptoto/IB-3=3, proto/IB-22=1, P/IA-18=1, proto/IB-23=1, CU/IB-1 =1, CU/IB-3=3, H/IB-3=2, M/IA-6=1, O/IA-6=2, O/IB-3=1, P/IA-8=1, P/IB-3=1, PO/IB-1=1, ND/IB-22=1; e) 5 aislamientos fueron también CMTR; Susc= susceptibles.

Tabla 4. Porcentajes acumulados de los valores de CIM en seis cepas PPNG aisladas en Cuba (1995-1998).

Drogas	Concentración Inhibitoria Mínima ($\mu\text{g}/\text{mL}$)																	
	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	> 128
Pen															1/16,7	1/33,3	2/66,7	2/100
Tet										1/16,7	2/50,0		3/100					
Espec													1/16,7	5/100				
Ceft		2/33,3		3/83,3	1/100													
Cipro		2/33,3	1/83,3	1/66,7	2/100													
Azit								1/16,7	3/66,7	2/100								

a) Pen = penicilina; Tet = tetraciclina; Espec = espectinomicina; Ceft = ceftriaxona; Cipro = ciprofloxacina; Azit = azitromicina

Tabla 5. Patrones de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Neisseria gonorrhoeae* del tracto urogenital.

Patrón de susceptibilidad antimicrobiana	n	%
Penicilina / Tetraciclina	56	61,5
Penicilina / Tetraciclina / Azitromicina	4	4,4
Tetraciclina / Azitromicina	1	1,1
Penicilina	2	2,2
Tetraciclina	15	16,5
Susceptibles a todos los antimicrobianos	13	14,3
Total	91	100

Tabla 6. Clases de susceptibilidad antimicrobiana y perfil plasmídico en 91 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas en Cuba (1995-1998).

Perfiles	Clases de susceptibilidad antimicrobiana			
	no-PP/TRNG n=27	PPNG n=6	PP/TRNG n=45	TRNG n= 13
<i>Libre de Plasmidios</i>	2			
2,6 - 24,5 MDa	15			
2,6 MDa	10			
2,6 - 25,2 MDa				13
2,6 - 3,2 MDa		3		
2,6 - 3,2 - 25,2 MDa			45	
2,6 - 4,5 - 24,5 MDa		3		

Tabla 7. Contenido de plasmidios y determinante *tet-M* en 91 cepas aisladas en Cuba (1995-1998).

Tipo de TRNG (<i>tet-M</i>)	Perfil plasmídico / No. (%)						
	Ninguno	2,6	2,6/24,5	2,6/25,2	2,6/3,2	2,6/3,2/25,2	2,6/4,5/24,5
Americano				4(4,4)		44(48,4) ^a	
Holandés				9(9,9) ^a		1 (1,1)	
no-TRNG	2(2,2)	10(10,9)	15(16,5)		3(3,3)		3(3,3)

a)= asociación significativa del determinante *tetM* con el perfil plasmídico (Test exacto de Fisher, $p < 0,0001$).

Tabla 8. Distribución de auxotipos según categorías de susceptibilidad antimicrobiana de 91 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas en Cuba (1995-1998).

Auxotipos	Categorías de susceptibilidad									
	PP/TRNG		TRNG		PPNG		No-PP/TRNG		TOTAL	
	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%
Proto	41	91,1	4	30,8	4	66,7	15	55,6	64 ^a	70,3
P⁻	1	2,2	9	69,2	2	33,3	2	7,4	14	15,4
CU⁻	0	0	0	0	0	0	5	18,5	5	5,5
O⁻	2	4,4	0	0	0	0	1	3,7	3	3,3
H⁻	0	0	0	0	0	0	2	7,4	2	2,2
PO⁻	0	0	0	0	0	0	1	3,7	1	1,1
M⁻	1	2,2	0	0	0	0	0	0	1	1,1
ND	0	0	0	0	0	0	1	3,7	1	1,1
Total	45	100	13	100	6	100	27	100	91	100

a) 43 de estos aislamientos contienen el plasmidio de 3,2 MDa

Tabla 9. Distribución de serovares según categorías de susceptibilidad antimicrobiana de 91 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas en Cuba (1995-1998).

Serovares	Categorías de susceptibilidad									
	PP/TRNG		TRNG		PPNG		No-PP/TRNG		TOTAL	
	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%
IA-6	36	80	11	84,6	2 ^a	33,3	0	0	49	53,8
IB-1	1	2,2	0	0	3 ^a	50	14	51,9	19	19,8
IB-3	1	2,2	0	0	0	0	8	27,6	9	9,9
IA-3	4	8,9	0	0	0	0	0	0	4	4,4
IA-8	2	4,4	1	7,7	0	0	0	0	3	3,3
IB-2	0	0	1	7,7	0	0	2	7,4	3	3,3
IB-22	0	0	0	0	1	16,7	1	3,7	2	2,2
IA-18	0	0	0	0	0	0	1	3,7	1	1,1
IA-21	1	2,2	0	0	0	0	0	0	1	1,1
IB-23	0	0	0	0	0	0	1	3,7	1	1,1
Total	45	100	13	100	6	100	27	100	91	100

IA = serogrupo WI, 63,7% del total aislamientos; **IB** = serogrupo WII/III, 39,3% del total de aislamientos; a) = aislamientos que contienen el plasmidio de 4,5 MDa.

Tabla 10. Distribución de Auxotipos/Serovares según categorías de susceptibilidad antimicrobiana de 91 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas en Cuba (1995-1998).

Clases A/S	Categorías de susceptibilidad									
	PP/TRNG		TRNG		PPNG		No-PP/TRNG		TOTAL	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Proto/IA-6	32 ^a	35,2	3	3,3	0	0	0	0	35	38,5
Proto/IB-1	1	1,1	0	0	3	3,3	11 ^c	12,0	15	16,4
P ⁻ /IA-6	1	1,1	8 ^b	8,8	2	2,2	0	0	11	12,1
Proto/IA-3	4	4,4	0	0	0	0	0	0	4	4,4
CU/IB-3	0	0	0	0	0	0	3	3,3	3	3,3
Proto/IB-2	0	0	1	1,1	0	0	2	2,2	3	3,3
Proto/IA-8	2	2,2	0	0	0	0	0	0	2	2,2
H/IB-3	0	0	0	0	0	0	2	2,2	2	2,2
O/IA-6	2	2,2	0	0	0	0	0	0	2	2,2
Proto/IB-3	1	1,1	0	0	0	0	2	2,2	3	3,3
Proto/IB-22	0	0	0	0	1	1,1	0	0	1	1,1
P ⁻ /IA-18	0	0	0	0	0	0	1	1,1	1	1,1
Proto/IA-21	1	1,1	0	0	0	0	0	0	1	1,1
Proto/IB-23	0	0	0	0	0	0	1	1,1	1	1,1
PO/IB-1	0	0	0	0	0	0	1	1,1	1	1,1
CU/IB-1	0	0	0	0	0	0	1	1,1	1	1,1
M/IA-6	1	1,1	0	0	0	0	0	0	1	1,1
ND/IB-22	0	0	0	0	0	0	1	1,1	1	1,1
P ⁻ /IB-3	0	0	0	0	0	0	1	1,1	1	1,1
O/IB-3	0	0	0	0	0	0	1	1,1	1	1,1
P ⁻ /IA-8	0	0	1	1,1	0	0	0	0	1	1,1
Total	45	49,5	13	14,3	6	6,6	27	29,6	91	100

a)= todos los aislamientos portan el determinante *tet-M* tipo Americano; b)= siete aislamientos portan el determinante *tet-M* tipo Holandés y uno el tipo Americano; c)= nueve aislamientos con el perfil plasmídico 2,6-24,5 MDa.

Tabla 11. Patrones de PFGE de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* pertenecientes a las tres clases mayores de A/S.

Clases A/S (n)	Contenido de Plasmidios	No. aislamientos (%)	<i>NheI</i>	<i>SpeI</i>	<i>NheI/SpeI</i>
proto/IA-6 (35)	2,6+3,2+25,2D ^{a,c}	17 (27,9)	I	I	I
	2,6+3,2+25,2D ^{b,c}	5 (8,2)	II	I	II
	2,6+3,2+25,2D ^c	5 (9,8)	II	II	III
	2,6+3,2+25,2D ^c	2 (3,3)	I	II	IV
	2,6+3,2+25,2D ^c	1 (1,6)	III	II	V
	2,6+3,2+25,2D ^c	1 (1,6)	IV	I	VI
	2,6+3,2+25,2D ^c	1 (1,6)	V	I	VII
	2,6+3,2+25,2D ^c	1 (1,6)	VI	III	VIII
	2,6+3,2+25,2D ^c	1(1,6)	VII	I	IX
	2,6+3,2+25,2D ^c	1 (1,6)		ND	
P ⁻ /IA-6 (11)	2,6+25,2D ^d	3 (4,9)	VIII	IV	X
	2,6+25,2D ^d	3 (4,9)	IX	IV	XI
	2,6+25,2D ^c	1 (1,6)	X	IV	XII
		4 (6,6)		ND	
Proto/IB-1 (15)	2,6+24,5	5 (8,2)	XI	V	XIII
	2,6+24,5	1 (1,6)	XII	VI	XIV
	2,6+24,5	1 (1,6)	XIII	V	XV
	2,6+24,5	2 (3,3)	XIV	VI	XVI
	2,6	1 (1,6)	XV	VII	XVII
	2,6+4,5+24,5	1 (1,6)	XVI	VIII	XVIII
	4 (6,6)		ND		

a)= Un aislamiento no porta el plasmidio de 3,2 MDa. b)= Dos aislamientos no portan el plasmidio de 3,2 MDa.; c)= portan el determinante *tet-M* tipo Americano; d)= portan el determinante *tet-M* tipo Holandés; ND= no determinado.

IV.19. Figuras

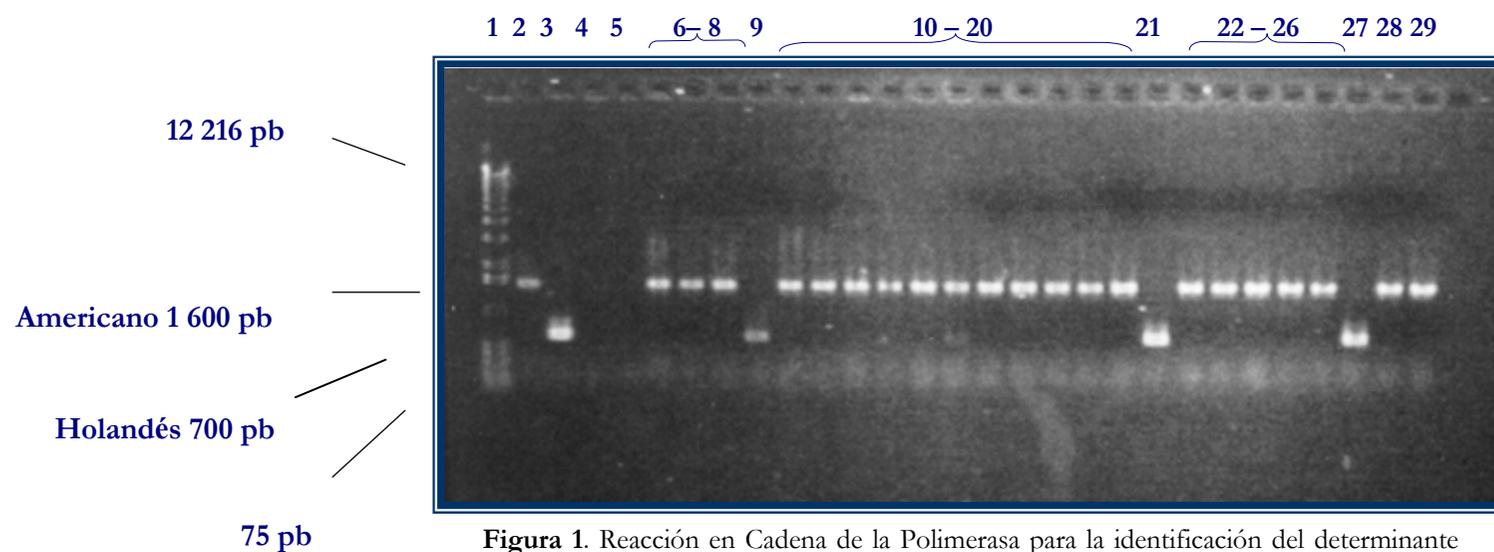


Figura 1. Reacción en Cadena de la Polimerasa para la identificación del determinante *tet-M*. Línea 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb; Línea 2: cepa control NG-6418, determinante *tet-M* tipo Americano; Línea 3: cepa control 2903, determinante *tet-M* tipo Holandés; Líneas 4 y 5 controles negativos; Líneas 9, 21, 27: cepas de estudio con el determinante *tet-M* tipo Holandés; Líneas 6-8, 10-20, 22-26, 28 y 29: cepas de estudio con el determinante *tet-M* tipo Americano.

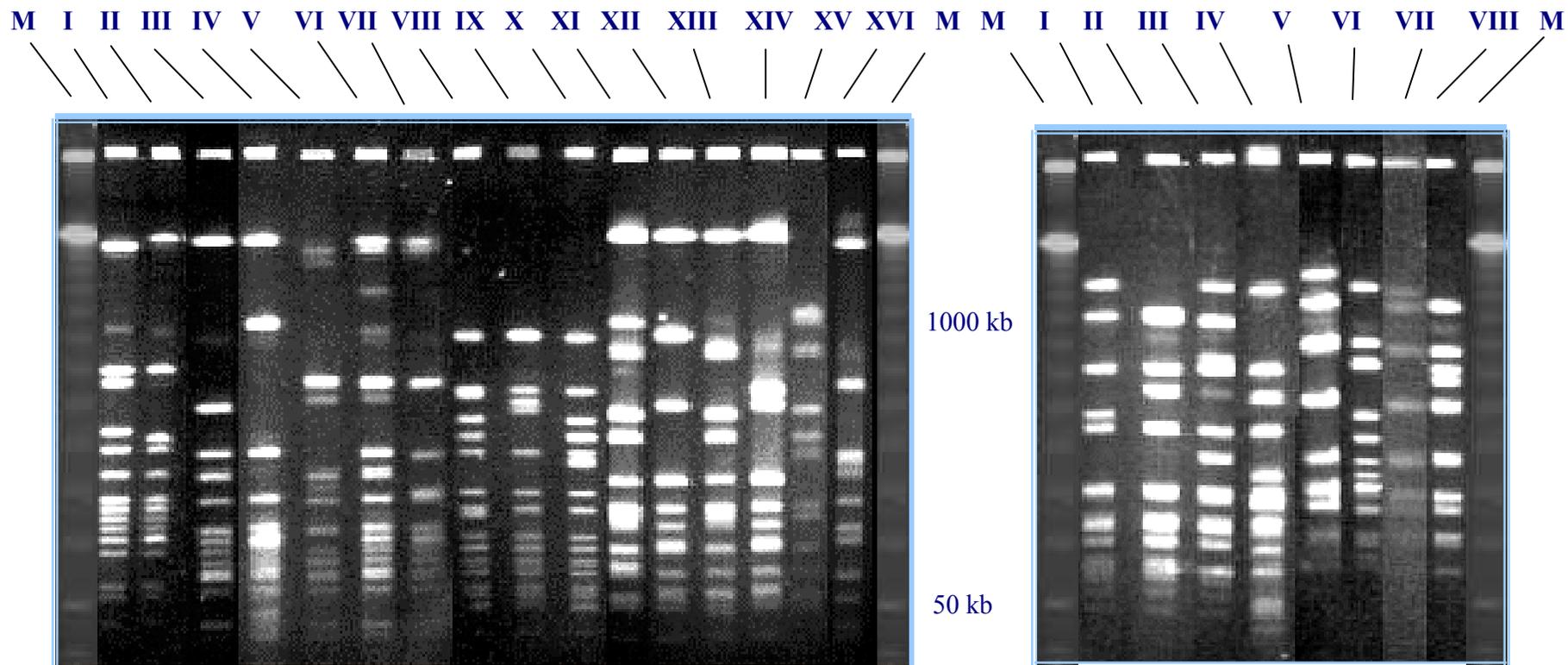


Figura 2. Patrones de PFGE obtenidos con la enzima de restricción *NheI* en 52 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas de muestras urogenitales. M= marcador lambda de PFGE.

Figura 3. Patrones de PFGE obtenidos con la enzima de restricción *SpeI* en 52 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas de muestras urogenitales. M= Marcador Lambda de PFGE.

CAPÍTULO V- DISCUSIÓN

La gonorrea continua siendo un problema serio de salud, el cual afecta de forma no proporcional a adolescentes, adultos jóvenes y a una minoría en países industrializados (Fox *et al.*, 1998), y a amplios grupos de poblaciones en países subdesarrollados (Fox y Knapp, 1999). Aunque la incidencia ha declinado en muchos países desarrollados, la proporción de infecciones causadas por cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes se ha incrementado en todo el mundo. En muchos países, el manejo de la gonorrea y otras infecciones de transmisión sexual está basado en algoritmos de tratamientos relacionados con la interpretación sindrómica. Una importante medida para prevenir la diseminación de cepas resistentes a los antibióticos que corrientemente están en uso es una vigilancia continua o centinela de la susceptibilidad *in vitro* de los aislamientos más recientes de *N. gonorrhoeae* (WHO Scientific Group, 1978; Center for Disease Control, 1987). La resistencia antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* es muy cambiante especialmente en donde regímenes de tratamiento bien establecidos son aplicados de forma no eficiente (Lind, 1984; Lind 1986).

Desde principios de la década del setenta, se recomienda la penicilina y la tetraciclina como primera y segunda droga de elección en el tratamiento de la gonorrea según el Programa de Control de dicha enfermedad en Cuba (Ministerio de Salud Pública, 1997 a).

Consideramos que nuestras cepas de estudio no son representativas, desde el punto de vista estadístico, de todas las variantes posibles del reservorio de resistencia antimicrobiana que constituyen los aislamientos que circulan en nuestro medio. Es notable, por ejemplo, que el mayor número de aislamientos proceda de Ciudad de la Habana y que solamente de dicha provincia se recibieran cepas en los 4 años que comprende este estudio. Lamentablemente hubo, además, provincias que no enviaron cepas o que de haberlas enviado no resultaron viables para ser parte del presente trabajo Tabla 3. El cultivo de *N. gonorrhoeae* es costoso y el Programa de Control de la gonorrea de Cuba recomienda la coloración de Gram como método diagnóstico de la enfermedad gonocócica tanto en el hombre como la mujer; tal disposición y la posible falta de personal entrenado en el diagnóstico por cultivo, unido a las difíciles condiciones de transporte requeridas para este germen, han comprometido la cantidad y calidad de los aislamientos que arriban al Laboratorio Nacional de Referencia de Neisserias Patógenas.

V.1. Susceptibilidad a la penicilina

Un 68,1% de las cepas estudiadas resultaron ser resistentes a la penicilina, de éstas el 82,3% se debió a la presencia de alguna clase de plasmidio R que codifican para la producción de penicilinasas y alcanzaron el 56% sobre los 91 aislamientos. La emergencia de cepas PPNG constituye un hallazgo frecuente en todo el mundo, alcanzando valores significativos en Singapur para el 35% (Chan y Thirumoorthy, 1987), en Filipinas 30-70% (Clendennen, 1992), Gambia 49% (Ison *et al.*, 1992 a) y Malawi 36% (Ison *et al.*, 1992 b). Nuestros resultados se asemejan a los reportados en dichas áreas, así como a aquellos reportados en Centroamérica y el Caribe donde más de un 50% de los aislamientos de gonococo son productores de penicilinasas (PPNG) (Venegas *et al.*, 1991; Castro *et al.*, 1993; Knapp *et al.*, 1995)- en Honduras, 83% de gonococos aislados en trabajadores del sexo en 1989 fueron PPNG (Venegas *et al.*, 1991), 78% de los aislamientos en Nicaragua en el mismo año fueron PPNG (Castro *et al.*, 1993) y valores similarmente altos fueron reportados en Jamaica entre 1990 y 1991 (62,9%) (Knapp *et al.*, 1995); nuestros hallazgos están por encima de los de América Latina (Fiorito *et al.*, 1993; Ison, 1995; Fiorito *et al.*, 1997) y por debajo de los datos reportados en otras investigaciones realizadas en África (Desai *et al.*, 1990).

En 1979 se detectó en Cuba por primera vez una cepa de gonococo productora de penicilinasas (Almanza C, 1979). Delgado *et al.* (1989), entre 1983 y 1985, no encontraron cepas de *N. gonorrhoeae* con resistencia a la penicilina, pero el 63% sí mostró susceptibilidad disminuida. Algunos estudios desarrollados en Ciudad de la Habana ya habían reportado altas proporciones de *N. gonorrhoeae* productoras de penicilinasas (Almanza C, 1988; Berroa M, 1988). En 1989, 24 cepas aisladas en Cuba fueron estudiadas por Dillon JR en Canadá (1990), que resultó en un 37,5% de las cepas PPNG. Estos estudios constituyen casi el total de los antecedentes a la presente investigación (1995-1998), relacionados con la susceptibilidad antimicrobiana y caracterización de aislamientos de *N. gonorrhoeae* que circulan en nuestro medio.

Al comparar los resultados del año 1989 (Dillon JR, 1990) con los de nuestro estudio, el incremento de cepas PPNG representó un 18,5%. Está descrito que una vez que la resistencia mediada por plasmidios se introduce en una población bacteriana, ésta tiende a la permanencia e incremento (Lind *et al.*, 1991; Chu *et al.*, 1992; Chenia, 1997). Por ejemplo, en Taiwán hubo un dramático incremento de aislamientos PPNG a partir de 1976 (alrededor del 5%) hasta 1985 (50%). Además, se observó una estabilidad en valores de 57-62% durante 1985 a 1990, aún después de haber puesto

fin a la penicilina como droga de elección en la profilaxis y tratamiento de la gonorrea (Chu *et al.*, 1992). De manera similar, en Canadá se reportó un incremento del 77% de cepas PPNG desde 59 cepas en 1988 a 1 046 en 1989 (Anónimo, 1991).

En otros países como Estados Unidos, la proporción de cepas con altos niveles de resistencia a la penicilina no es elevada, sin embargo, se han reportado brotes localizados de las mismas (Rothenberg y Voigth, 1988; Handsfield *et al.*, 1989).

En las Américas, excluyendo Estados Unidos de Norte América y Canadá, informes provenientes de 10 países en 1995 indicaron que de 10 500 aislamientos el 10% era PPNG, lo que es superior al 5% confirmado en 1990 (Ison *et al.*, 1998b).

En nuestro trabajo, solamente en 11 de las 91 cepas (12,1%) se encontró resistencia de origen cromosómico (CIM ≥ 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, no-PPNG) a la penicilina. La resistencia cromosomal a la penicilina es de bajo nivel y resulta de las mutaciones en múltiples locus, incluyendo el *penA*, *mtr* y *penB*. Los efectos aditivos de estas mutaciones pueden incrementar la CIM desde $\leq 0,06$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ en una cepa susceptible hasta ≥ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con el consecuente incremento de fracasos terapéuticos; el hallazgo de cepas de *N. gonorrhoeae* con resistencia cromosómica a la penicilina es de gran interés ya que la susceptibilidad disminuida a las cefalosporinas, tales como cefuroxima, cefotaxima y ceftriaxona parece ser conferida por mutaciones en el mismo locus (William *et al.*, 1988; Ison, 1996). Los cambios en la prevalencia de cepas con resistencia cromosómica están asociados a cambios en los regímenes de tratamiento (Lind, 1997).

En Argentina la proporción de cepas CMPR alcanzó un 19% en 1996 (Fiorito *et al.*, 1997); en Estados Unidos, según el Proyecto de Vigilancia de Aislamientos de Gonococo (GISP) se reportó un 17,9% de cepas resistentes a la penicilina con un 12,8% de aislamientos CMPR (Anónimo, 1998b).

Existen datos provenientes de países de la región Oeste del Pacífico que señalan un incremento de la resistencia cromosomal a las penicilinas y/o fluoroquinolonas. En Hong Kong, los aislamientos con resistencia cromosomal a la penicilina representan el 66,4% mientras que la proporción de PPNG ha declinado hasta 2,6% (Kam *et al.*, 1995).

En la región del Sudeste de Asia, estudios de cepas aisladas de Tailandia e Indonesia muestran una alta proporción de ambas, PPNG (17%) y CMPR (51%) (Knapp *et al.*, 1997 a; Lind y Hutapea, 1997). Porcentajes de cepas CMPR similares a los nuestros se reportan en países de África como Zaire y Kenia (van Dyck *et al.*, 1997; Claeys *et al.*, 1998).

En algunas regiones de Europa se emplea aún la penicilina para el tratamiento de la gonorrea en ciertas circunstancias (Fitzgerald, 1997). Sin embargo, cepas resistentes a las penicilinas son aisladas de casos importados, y por esta razón la resistencia a este grupo de antibióticos llega a alcanzar niveles importantes (Lewis *et al.*, 1995; Backman *et al.*, 1996; Kyriakis *et al.*, 1999). Finalmente en Escocia, 1996 fue un año en el que se señaló un 2,6% de PPNG y un 5% de CMPR (Young *et al.*, 1997).

V.2. Susceptibilidad a la tetraciclina

Resulta muy relevante el hecho de encontrar que el 84,6% de las cepas estudiadas resultaron resistentes ($CIM \geq 2\mu\text{g}/\text{mL}$) a la tetraciclina y ninguna susceptible ($CIM \leq 0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$). Una parte importante de los aislamientos estudiados (58/63,7%) tenían resistencia plasmídica a este antibiótico, siendo específicamente el plasmidio conjugativo de 25,2 MDa (con el determinante *tet-M* incluido) el responsable del alto nivel de resistencia a la tetraciclina. Cuando comparamos estos resultados con lo reportado en el año 1989 por Dillon JR(1990), donde un 29,2% de las cepas resultaron ser resistentes, vemos que el perfil de resistencia contra este antimicrobiano se ha modificado considerablemente con un incremento no solo del número de cepas resistentes sino también en los valores de CIM. Así, en 1989 ninguna cepa mostró CIM superior a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En el presente trabajo (1995-1998) ya se detectan cepas con $CIM \geq 32 \mu\text{g}/\text{mL}$. El fenómeno de alto nivel de resistencia a la tetraciclina se reporta de manera frecuente en muchas partes del mundo (Dillon y Carballo, 1990; West *et al.*, 1995). Hay informes que indican una diseminación de cepas de gonococo con tales características por los Estados Unidos y su aparición en Europa (Knapp *et al.*, 1987b; van Klingeren y Dessens-Kroon, 1989; Ison *et al.*, 1988; Center for Diseases Control, 1990). En 1997, un estudio del GISP detectó en Estados Unidos un 25,6% de cepas resistentes a la tetraciclina, de las cuales el 17% tuvieron CMTR y el 8,6% fueron TRNG (Anónimo, 1998b). Nuestros resultados están por encima de la media reportada para el resto de las Américas, aunque colecciones de datos regionales han demostrado un incremento de cepas TRNG desde menos del 5% en 1990 hasta alrededor del 15% en 1995 (Ison *et al.*, 1998 b). Otros autores señalan la

proporción de TRNG en países del Caribe y América Latina, entre 1993 y 1995, en el rango de 6% al 63% y entre 5% y 71% para cepas que exhibían CMTR (Dillon y Li, 1997).

El alto nivel de resistencia a la tetraciclina en países de la región Oeste del Pacífico está ampliamente distribuida pero las proporciones no son uniformes (Singapur 84%, Vietnam 35,9%, Islas Salomón 74%), mientras que otros países reportan por debajo del 10% (WHO Western Pacific Region Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme, 1997).

En el Sudeste de Asia las cepas TRNG ocurren de manera prominente. En Tailandia se reportó un 16% de cepas TRNG y un 55% de cepas CMTR (Knapp *et al.*, 1997 a). Indonesia tiene una alta proporción de cepas TRNG, y virtualmente todas las cepas mostraron alguna forma de resistencia a la tetraciclina (Lind y Hutapea, 1997; Djajakusumah *et al.*, 1998), resultado muy similar a nuestros hallazgos. En la India, Bhalla *et al.* (1998) encontraron 28% de TRNG en 50 aislamientos consecutivos en Nueva Delhi. Un 10% de 94 cepas estudiadas en Bangladesh fueron TRNG en 1997 (Bhuiyan *et al.*, 1999).

En países de África el fenómeno de la resistencia adquiere la mayor relevancia (van Dyck *et al.*, 1997; West *et al.*, 1995). Por ejemplo, hasta 1993 las cepas TRNG alcanzaron un 61% en Costa Marfil, 12% en Ruanda y 30% en Zaire. Específicamente en Ruanda (Bogaerts *et al.*, 1998) se observó este incremento a partir de 1989. Aislamientos TRNG estuvieron ausentes en cepas examinadas en Durban y Sudáfrica hasta 1993 (Chenia *et al.*, 1997). Otros datos también indican que las cepas TRNG están diseminadas en África con un 82% en Camerún, 65% en Etiopía, 21% en Mozambique y 62% en Zambia (van Dyck *et al.*, 1997).

Es notable que tanto para la penicilina como para la tetraciclina existan fluctuaciones en los porcentajes entre países o regiones contiguas. Una vez que la resistencia antimicrobiana se desarrolla en cepas de gonococo, éstos se perpetúan de forma creciente si los regímenes de tratamiento permanecen inalterados. Las cepas PPNG, TRNG, CMTR y CMPR se diseminan en áreas donde ocurre el uso no controlado de antibióticos, sobre todo en territorios importantes con una política informal de salud. Por otra parte, tal diseminación de la resistencia no sucede de forma inmediata ni es inevitable en todas las comunidades. La endemidad de cepas de gonococo resistentes sucede una vez que se alcanza una masa crítica de cepas resistentes que infectan a grupos de individuos que transmiten la enfermedad con alta frecuencia (por ejemplo: Trabajadores

comerciales del sexo) (Tapsall, 2001). Existen especulaciones acerca del uso de las quinolonas y su efecto de cura plasmídica en cepas de gonococo, y que este fenómeno explica en parte la disminución que ha ocurrido de las cepas TRNG y PPNG en un tiempo relativamente corto, como ha sucedido en Hong Kong para los aislamientos TRNG desde 4,5% hasta 2,1% en dos años (Kam *et al.*, 1995), aunque para esta hipótesis no existen datos experimentales concluyentes.

En investigaciones sobre la frecuencia de transferencia del plasmidio conjugativo de 25,2 MDa, se ha demostrado que otras neisserias o especies relacionadas portadoras de dicho plasmidio son capaces de transferirlo por conjugación a múltiples células receptoras, lo que determina un comportamiento endémicamente estable de este elemento genético en algunas áreas geográficas. Ello ha favorecido incluso la prevalencia de cepas de *N. gonorrhoeae* que albergan plasmidios R con determinantes que codifican para la producción de penicilinas y que pueden ser transferidos con la ayuda de las propiedades de conjugación de este plasmidio (Roberts y Knapp, 1989).

El hecho de que más del 60% de las cepas del presente estudio sean resistentes a la penicilina y la tetraciclina y que más del 50% lo sean a ambos antimicrobianos, explica la causa de frecuentes fracasos terapéuticos en nuestro medio; apoyamos tal afirmación sobre la base de nuestra propia experiencia y las de otros colegas (Almanza C, 1998; Llorente C, 1998).

Según observaciones realizadas, en Cuba una parte importante de los pacientes con gonorrea reciben tratamiento sin prescripción médica con penicilina o tetraciclina antes de acudir por primera vez a consulta en las instituciones de salud. Por esta razón los individuos infectados con cepas sensibles a estos antibióticos no llegan, en gran número de ocasiones, al nivel primario de atención médica. En algunos casos el régimen de tratamiento no ha sido total o correctamente implementado, lo cual favorece los mecanismos de adaptación evolutivos para la resistencia de *N. gonorrhoeae* a estos antimicrobianos (Barrero E, 1995). En otros, a pesar del buen establecimiento de la terapia, ocurren fracasos terapéuticos que definitivamente están asociados con cepas de *N. gonorrhoeae* cuyos valores de CIM son elevados (Reyn, 1944; Dunlop, 1949; Del Love y Finland, 1955; Martin, *et al.*, 1970; Holmes, 1973; Kampmeier, 1983) y obligan al paciente enfermo a recibir atención con el especialista; sólo en tales circunstancias se practica el cultivo y aislamiento de cepas de gonococo que posteriormente son enviadas al Laboratorio Nacional de Referencia (Barrero E, 1995). El empleo de la penicilina y la tetraciclina como primera y segunda droga de elección durante

casi tres décadas en el tratamiento de la gonorrea, la ausencia del monitoreo sistemático de la susceptibilidad a estos antimicrobianos y lo antes expuesto, explican el porcentaje creciente de cepas resistentes a la penicilina y tetraciclina encontradas en nuestro estudio respecto a los resultados obtenidos en aislamientos de finales de la década del ochenta en nuestro país (Delgado *et al.*, 1989; Dillon JR, 1990).

La OMS establece que regímenes terapéuticos que logran menos del 95% de cura han estado asociados históricamente a un rápido incremento en la prevalencia de organismos resistentes, y por lo tanto aquellos con un porcentaje de cura entre 90-95% deben ser utilizados con precaución ya que aislamientos resistentes podrían ser seleccionados (Anónimo, 1997).

En nuestro trabajo existe un predominio de la resistencia de alto nivel a la penicilina y a la tetraciclina (mediada por plasmidios) sobre la resistencia cromosómica; tal hallazgo podría estar determinado también, como se ha sugerido en otros artículos (Lind, 1997), por el hecho de que mientras las cepas PPNG y TRNG son detectadas de la manera más confiable y evidente (por ejemplo a través de la determinación de la producción de penicilinasas, de la CIM ≥ 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la tetraciclina y la identificación del determinante *tet-M*), la resistencia mediada por cromosoma podría no ser revelada por el empleo solamente de la determinación de la CIM.

También podemos especular que el mayor número de aislamientos PP/TRNG (49,5%) sobre los PPNG (6,6%) y TRNG (14,3%) encontrados en Cuba está estrechamente vinculado con el uso amplio y popular de la penicilina en combinación con la tetraciclina, encaminados al tratamiento de la gonorrea/infección por *Chlamydia*, resultando en la eliminación de una parte importante de cepas TRNG y PPNG.

V.3. Susceptibilidad a la azitromicina

El uso de este nuevo macrólido en el tratamiento de la gonorrea ha sido explorado debido a su eficacia en el tratamiento de enfermedades de transmisión sexual producidas por *Chlamydia trachomatis* y en reconocimiento de la alta frecuencia de co-infección con *N. gonorrhoeae* y uretritis post-gonocócica. La azitromicina ofrece el posible empleo de una sola dosis oral siendo efectiva contra ambos *N. gonorrhoeae* (2 g) y *C. trachomatis* (1 g). Esta droga es usada con tal propósito en

Brasil (Dillon *et al.*, 2001a). A pesar de que en Cuba no existen reportes del uso de la azitromicina en el tratamiento de la enfermedad gonocócica, se encontraron resistencia (CIM ≥ 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y susceptibilidad intermedia (CIM 0,25-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en 5 (CIM 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 49 aislamientos de nuestro estudio, respectivamente. Esto puede estar relacionado al frecuente uso de la eritromicina en el tratamiento de la gonorrea en pacientes alérgicos a la penicilina. La resistencia cruzada entre la azitromicina y la eritromicina ha sido ampliamente reportada. En 1989, se reportó un 29,2% de resistencia a la eritromicina en cepas aisladas en Cuba (Dillon JR, 1990). Resultados similares a los nuestros han sido reportados en países de América Latina para la azitromicina (Roberts *et al.*, 1999; Zarantonelli *et al.*, 1999; Dillon *et al.*, 2001a; Dillon *et al.*, 2001b). Sin embargo, el CDC, Atlanta (Estados Unidos de Norte América) no prioriza esta droga para el tratamiento de la gonorrea debido a que es muy costosa, tiene efectos secundarios gastrointestinales a las dosis mencionadas (2 g por dosis para *N. gonorrhoeae*), y es frecuente la resistencia cruzada a éste y otros macrólidos por experiencia previa con la eritromicina (Handsfield *et al.*, 1994; Center for Disease Control, 2000).

Son interesantes los valores de CIM₅₀ y ₉₀ obtenidos para la azitromicina (0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), la tetraciclina (1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 4,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y la penicilina (1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 4,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en las 27 cepas no-PP/TRNG de nuestro estudio. Las CIMs de dichos aislamientos se mueven entre los valores de susceptibilidad intermedia para la azitromicina y valores considerados en el límite máximo de susceptibilidad intermedia y resistencia para la penicilina y la tetraciclina. Esto sugiere una posible correlación lineal entre los niveles de CIM de la azitromicina con los de la tetraciclina y la penicilina.

Como parte de un estudio de vigilancia activa para monitorear la emergencia de cepas resistentes a la azitromicina, Zarantonelli *et al.* (1999) examinaron los niveles de susceptibilidad a este antimicrobiano en 51 aislamientos consecutivos obtenidos de hombres con uretritis gonocócica no complicada; el hallazgo de gonococos con susceptibilidad disminuida fue un hecho común, tal fenómeno puede ser explicado, en parte, por mutaciones en el complejo *mtr*.

Ha sido descrita una correlación lineal significativa entre valores logarítmicos de CIMs de la tetraciclina y azitromicina con los de la eritromicina, cuyo origen está relacionado con alteraciones en el funcionamiento de un grupo de genes *mtrCDE* (unidad transcripcional), regulados negativamente por el gen *mtrR* y que controlan la susceptibilidad a la eritromicina y otros agentes

hidrófobos y detergentes, lo que explica la resistencia cruzada entre dichos agentes (Ison, 1996; Zarantonelli *et al.*, 1999).

Sin embargo, entre los 27 aislamientos no-PP/TRNG de nuestro trabajo no fue posible encontrar una correlación lineal significativa entre los valores de CIMs logarítmicos para la tetraciclina y la azitromicina ($r = 0,17636891$ [$P = 0,38$]) (datos no mostrados). Zarantonelli *et al.*, (1999), utilizando los criterios de Morse *et al.*, (1982), encontraron que el fenotipo Mtr (elevada resistencia al cristal violeta y al Triton X-100) fue expresado en el 50% de las cepas con susceptibilidad intermedia a la tetraciclina, azitromicina y eritromicina; tales cepas fueron más resistentes a dichas drogas, comparado con el nivel de resistencia exhibido por aquellos aislamientos sin el fenotipo Mtr. Nuestro hallazgo puede explicarse por el hecho de que en el mecanismo de resistencia a la tetraciclina no sólo participan mutaciones en el locus *mtr* sino también en el *penB*.

En un estudio realizado por Tapsall *et al.*(1998 b) fueron reportados cinco casos de fracaso terapéutico ante la administración de 1 g de azitromicina; las cepas aisladas de estos pacientes exhibieron CIMs de 0,125 a 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se arribó a la conclusión de que la correlación de resultados de las CIMs/dosis-tratamiento usualmente encontradas en gonorrea no son aplicables para azitromicina ya que los factores farmacocinéticos pueden disminuir el valor predictivo de los datos obtenidos por CIM. A pesar de ello, este antimicrobiano es considerado una de las alternativas de tratamiento de la gonorrea no complicada, pero sosteniendo una vigilancia y monitoreo de los patrones de susceptibilidad con el fin de determinar la emergencia temprana de resistencia (Tapsall *et al.*, 1998 b).

V.4. Susceptibilidad a la ciprofloxacina

El total de nuestros aislamientos fueron susceptibles a la espectinomicina, ciprofloxacina y ceftriaxona, lo que coincide con datos procedentes de estudios realizados en el sur de África (Ison *et al.*, 1992 b).

En nuestro trabajo fueron notables cuatro aislamientos que mostraron una CIM de 0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la ciprofloxacina, valor inmediato al rango estimado para la categoría de susceptibilidad intermedia. Las fluoroquinolonas son una popular alternativa y tienen la ventaja de ser altamente

eficaces contra cepas resistentes a la penicilina, pero la resistencia a quinolonas necesita ser monitoreada (Lewis *et al.*, 1994). En Cuba, ya existe el primer informe de una cepa resistente a la ciprofloxacina aislada en 1997 del área genital de un paciente masculino (Llanes *et al.*, 2001). De cualquier manera creemos muy probable que el 95% o más de las cepas de *N. gonorrhoeae* que circulan en nuestro medio sean susceptibles a la ciprofloxacina, teniendo en cuenta el patrón de susceptibilidad obtenido en los 91 aislamientos estudiados procedentes de varias provincias.

Recientemente, se ha demostrado que aislamientos clínicos de *N. gonorrhoeae* con susceptibilidad intermedia a la ciprofloxacina tienen una sola sustitución de un aminoácido en la subunidad GyrA de la girasa de ADN, mientras que las cepas resistentes tienen dos sustituciones en GyrA y adicionalmente una sola sustitución en uno de los aminoácidos de la proteína ParC (Degushi *et al.*, 1996; Degushi *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1998). Dos informes se refieren a cepas con CIMs de 8,0-64,0 µg/mL para la ciprofloxacina, teniendo ambas dos sustituciones GyrA y dos ParC (Tanaka *et al.*, 1998; Trees *et al.*, 1998).

Cuando examinamos la historia de la adaptación al medio del gonococo, es llamativo que la velocidad de la aparición de resistencia frente a la ciprofloxacina ha sido mucho mayor que la que ha desarrollado frente a otros antibióticos como la penicilina y la tetraciclina (Center for Diseases Control, 1990). Las cepas de gonococo con susceptibilidad disminuida a una o más fluoroquinolonas fueron aisladas por primera vez a finales de los ochenta. Las CIMs para la ciprofloxacina fueron típicamente de 0,125 a 0,5 µg/mL (Willigen *et al.*, 1987; Knapp *et al.*, 1995). Estas cepas parecen haber emergido en el Lejano Oriente (Tanaka *et al.*, 1998), y ha ocurrido un incremento muy rápido en algunas áreas, como Filipinas con un incremento desde un 12% en 1994 hasta un 63% en 1996-1997 (Pato-Mesola *et al.*, 1997). También han sido introducidas en Australia, donde la prevalencia ha alcanzado el 12,4% (Tapsall *et al.*, 1998a) y están siendo reportados esporádicamente en las Américas y el Caribe (Ison *et al.*, 1998 b).

Los aislamientos que han experimentado una disminución de la susceptibilidad a las fluoroquinolonas pueden ser categorizados como con susceptibilidad intermedia (MIC 0,125-0,5 µg/mL) o resistentes (CIM \geq 1,0 µg/mL) a la ciprofloxacina (Bayer Pharmaceuticals, West Haven, CT, USA) o fluoroquinolonas con una actividad equivalente como ofloxacin (Ortho-McNeil

Pharmaceuticals, Raritan, NJ, USA). El alto nivel de resistencia ha sido comúnmente descrito en el Lejano Oriente, específicamente en las Filipinas, Hong Kong, y Japón (Kam *et al.*, 1995; Abeyewickereme *et al.*, 1996; Tapsall *et al.*, 1996; Knapp *et al.*, 1997 b). Según el GISP, conducido por el CDC, se detectó en 24 ciudades de los Estados Unidos de América una creciente prevalencia de cepas con bajo nivel de resistencia a las quinolonas (de 0,3% en 1991 a 1,3% in 1994, $P < 0,001$) (Handsfield y Whittington, 1996). En esta misma emisión, Gordon *et al.*(1996) describen también un gran brote de infecciones causadas por *N. gonorrhoeae* con susceptibilidad disminuida o bajo nivel de resistencia a la ciprofloxacina (CIM 0,125 a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en Cleveland, Ohio, donde el porcentaje de aislamientos con esta característica se incrementó desde un 2% hasta un 16% durante un periodo de tres años. En Cuba, se ha comenzado a emplear la ciprofloxacina como primera línea de tratamiento de la infección gonocócica de manera muy puntual e independiente a las sugerencias del Programa de Control de las Infecciones de Transmisión Sexual (ITS). Esta acción se viene realizando en algunas regiones o provincias, como Camagüey y Santiago de Cuba, desde hace aproximadamente 2 años. Además, recientes versiones de dicho programa (aún en revisión) implementarán el manejo sintomático de las ITS con el uso de esta droga en el control de la gonorrea. Un estudio actual realizado en la República de Filipinas encontró que 45% de las infecciones producidas por cepas de gonococo, que exhibían CIMs de 4,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o mayores, fracasaron para responder al tratamiento habitual de 500 mg en una sola dosis de ciprofloxacina (Aplasca *et al.*, 1997). Las experiencias citadas en otras regiones del mundo nos hace pensar que el continuo uso de este agente reducirá en un futuro cercano la inherente susceptibilidad en poblaciones de gonococos, trayendo, por consiguiente, el diseño necesario e inmediato de estrategias que garanticen la recuperación de cepas de *N. gonorrhoeae* para el monitoreo y vigilancia de la susceptibilidad antimicrobiana en varios sitios centinelas del país.

V.5. Susceptibilidad a la espectinomicina

A diferencia de la penicilina y la tetraciclina, la espectinomicina (Pharmacia and Upjohn, Inc., Kalamazoo, MI, USA) continúa siendo útil en el tratamiento de la gonorrea en muchas áreas geográficas (Fox y Knapp, 1999). No existen antecedentes publicados de fracaso terapéutico ni de resistencia *in vitro* a esta droga en Cuba. En el presente trabajo las 91 cepas de muestras urogenitales resultaron susceptibles a la espectinomicina.

La resistencia a esta droga ha emergido y se ha hecho prevalente de forma rápida cuando se ha usado como terapia de primera elección en la enfermedad gonocócica (Boslego *et al.*, 1987). Sin embargo, cuando ha sido reservada como régimen de tratamiento alternativo, la resistencia ha sido rara. En nuestro país algunos médicos han usado la espectinomicina como una alternativa del tratamiento de la gonorrea pero muy esporádicamente (Rodríguez M, 1995.). Los datos reunidos por el GISP sobre el tratamiento de la gonorrea en los Estados Unidos indican que, en 1997, solo el 0,7% de los pacientes fueron tratados con espectinomicina y 5 aislamientos resistentes a dicho antimicrobiano fueron identificados entre 50 985 cepas estudiadas en un período de 10 años (Fox y Knapp, 1999). En la región Oeste del Pacífico, el programa de vigilancia antimicrobiana para gonococo (GASP) identificó cuatro cepas resistentes entre 4 124 cepas estudiadas (Tapsall, 1997).

De forma regular, *N. gonorrhoeae* es susceptible a la espectinomicina en todo el mundo. En otras regiones como el Sudeste de Asia, de 94 cepas estudiadas en Bangladesh (1997) y 50 cepas de Bandung, Indonesia, el 100% fueron susceptibles a esta droga (Djajakusumah *et al.*, 1998; Bhuiyan *et al.*, 1999). En varios países de África la situación ha sido similar (West, 1995; van Dyck *et al.*, 1997; Bogaerts *et al.*, 1998).

Finalmente, varios estudios publicados en países de Europa (Lewis *et al.*, 1995; Nissinen *et al.*, 1997) y del Medio Oriente (Raddadi *et al.*, 1998) reportaron como susceptibles todos los aislamientos estudiados.

Aunque la resistencia a la espectinomicina no está ligada a la producción de penicilinas, su emergencia en cepas PPNG y la disponibilidad de tratamientos alternativos han hecho declinar su uso (Tapsall, 2001). Adicionalmente, son recordados fracasos al tratamiento con este antimicrobiano en cepas donde las CIMs fueron bajas en algunos estudios tempranos (Jaffe *et al.*, 1976). Posteriormente, se pensó que la pobre distribución del antimicrobiano desde el sitio de inyección intramuscular era la causa de este fenómeno (Tapsall, 2001).

V.6. Susceptibilidad a la ceftriaxona

Todavía no se han detectado cepas de *N. gonorrhoeae* capaces de elaborar β -lactamasas capaces de inactivar a cefalosporinas de tercera generación, como ya ha ocurrido en otros microorganismos gramnegativos. Así, la ceftriaxona es resistente a la actividad de la acción de la β -lactamasa TEM-1 de las cepas PPNG que circulan hoy día en todo el mundo (Tapsall, 2001).

No ha sido documentada resistencia clínicamente significativa de *N. gonorrhoeae* a la ceftriaxona (Roche Pharmaceutical, Wayne, NJ, USA). Las CIMs para la ceftriaxona en cepas de gonococo CMPR suelen ser más altas que en cepas susceptibles a la penicilina, debido probablemente a que alteraciones en las proteínas fijadoras de la penicilina (PBP) afectan a ambos antimicrobianos (Fox *et al.*, 1997; Fox y Knapp, 1999). Aunque se han reportado cepas que exhiben susceptibilidad disminuida a la ceftriaxona (CIM >0,25 µg/mL) (Fox *et al.*, 1997; Nissinen *et al.*, 1997), no se ha demostrado asociación de susceptibilidad disminuida *in vitro* con fracasos clínicos terapéuticos, ni con el uso de altas dosis de cefalosporinas (Fox *et al.*, 1997). Inclusive, la alta actividad de las cefalosporinas de tercera generación, especialmente de la ceftriaxona, ha sugerido la existencia de una considerable capacidad de reserva desde el punto de vista de la posibilidad de poder incrementar la dosis de este agente inyectable en un futuro. En efecto, las dosis de ceftriaxona recomendadas han sido reducidas en algunas directrices de tratamiento desde 250 mg a 125 mg en dosis única (Tapsall, 2001).

La ausencia sostenida de resistencia documentada a la ceftriaxona y otras cefalosporinas como la cefixima, que se emplean en el tratamiento de la gonorrea, está bien avalada por la importante utilización de estas drogas en los últimos 10 años (Fox y Knapp, 1999).

V.7. Análisis del perfil plasmídico

El perfil plasmídico más frecuente en nuestra investigación se encontró dentro del grupo de las cepas PP/TRNG (2,6-3,2-25,2 MDa) (49,5%). En el estudio de 1989 (Dillon JR, 1990), el perfil plasmídico 2,6 MDa representó el 33,3%, seguido del 2,6-24,5 MDa (25%), el 2,6-3,2-24,5 MDa (20,8%), el 2,6-3,2 MDa (8,3%) y el 2,6-4,5 MDa (8,3%) (Dillon JR, 1990); además, no se encontraron aislamientos TRNG (portadores del plasmidio de 25,2 MDa).

Es interesante no haber encontrado en nuestro trabajo cepas con la combinación de plasmidios 2,6 - 3,2 - 24,5 Mda. van Embden *et al.* (1981) identificaron por primera vez esta nueva combinación de plasmidios en cepas de *N. gonorrhoeae* en Holanda. En ese mismo año, son aisladas 5 cepas con esta combinación en Canadá (Dillon y Pauzé, 1981) y en 1982 Johnston y Kolator (1982), en Inglaterra, reportan dos de estos aislamientos. Aunque esto fue algo inusual por algún tiempo, ya existen en la literatura mundial reportes desde España, Uruguay, Argentina y Hawai, que

resaltan un alto porcentaje de cepas que albergan ambos tipos de plasmidios en combinación, para el 50.0%, 95.0%, 87.5% y 58.3%, respectivamente, sobre el total de cepas que portan el plasmidio del tipo Africano (3.2 MDa) (Borthagaray *et al.*, 1990; Vázquez, 1991; Fiorito, 1993; Sarafian *et al.*, 1992).

La manera que quizá se ha establecido progresivamente hasta nuestros días el plasmidio de 25,2 MDa en combinación con el de 3,2 MDa en nuestro medio, podría ser sugerida considerando algunas diferencias entre el plasmidio de 25,2 MDa y el de 24,5 MDa. El plasmidio de 25,2 MDa se asocia única y naturalmente con el de 3,2 MDa, por lo que este pudo tener su origen en una población de cepas de *N. gonorrhoeae* portadoras del plasmidio de 3,2 MDa, tales como aquellas prevalentes en Norte América, Europa, África y el Caribe (Roberts, 1989). Cepas que frecuentemente cohabitan de forma transitoria con *N. gonorrhoeae*, como *N. meningitidis*, otras *Neisserias* y *Kingella denitrifican*, portan naturalmente el plasmidio de 25,2 MDa. Estas especies no albergan normalmente al plasmidio de 24,5 MDa y los ensayos experimentales intentando introducirlo en *N. meningitidis* y otras especies de neisserias han sido infructuosos (Genco *et al.*, 1984). Sin embargo, ha sido demostrado que el plasmidio de 25,2 MDa puede ser transferido por conjugación, mantenido, y llevado de regreso a *N. gonorrhoeae* desde *N. meningitidis*, como también desde otras *Neisseria* spp. (Roberts y Knapp, 1988). En correspondencia con esto el plasmidio de 25,2 MDa cuenta con atributos determinantes y un importante reservorio en su medio ambiente.

Es notable la diferencia en la proporción de los plasmidios mayoritarios identificados en las cepas aisladas del tracto urogenital a finales de la década de los ochenta respecto a las 91 cepas de nuestro estudio (Tabla 15). Dillon JR en 1989 (1990) reportó un 45,83% de aislamientos con el plasmidio de 24,5 MDa; en el presente trabajo, solamente el 20,87% de las cepas presentó este plasmidio. Además, mientras la asociación del plasmidio de 3,2 MDa con el de 24,5 MDa fue detectada en 5 cepas del tracto urogenital a finales de los años ochenta, tal asociación no se encontró entre los 91 aislamientos urogenitales de nuestra investigación.

Cepas PP/TRNG que albergan la combinación de los plasmidios de 2,6-3,2-25,2 MDa han sido reportadas en países desarrollados como Holanda y en los Estados Unidos causando casos esporádicos o microepidemias (Roberts *et al.*, 1988).

Los perfiles plasmídicos han sido reconocidos como una herramienta excelente para la caracterización y estudio de la epidemiología global de *N. gonorrhoeae* y se ha comprobado en varios países del mundo que la distribución en el tiempo de los mismos, incluso en una misma área geográfica, puede variar considerablemente (Chu *et al.*, 1992), lo cual es manifiesto en las cepas que circulan en nuestro medio.

Estos dos trabajos, el presente y el referido a 1989 (Dillon JR, 1990), denotan un marcado predominio del plasmidio R de 3,2 MDa entre los aislamientos PPNG (desde 1989 hasta 1998); posiblemente la mayoría de nuestras cepas pudieron haber llegado a Cuba desde el continente Africano, donde cepas PPNG portadoras de esta clase de plasmidios son endémicas; este planteamiento lo soporta, además, la intensa actividad desarrollada por ciudadanos cubanos en dicha área desde la década de los ochenta.

El total de aislamientos de *N. gonorrhoeae* con alto nivel de resistencia a tetraciclina (58/63,7%) fueron portadores del plasmidio de 25,2 MDa (aproximadamente 40,6 kb), el cual posee el determinante de la resistencia de alto nivel a la tetraciclina *tet-M*. Gascoyne-Binzi *et al.* (1992), identificaron mediante análisis de restricción dos patrones de este plasmidio, uno correspondiente al tipo Americano y otro al tipo Holandés (Dutch). El tipo Americano mostró un patrón idéntico al de cepas TRNG aisladas en los Estados Unidos, examinadas por Morse *et al.*(1986). Posteriormente, Xia *et al.*(1995) definieron ambos tipos de determinante *tet-M* mediante un ensayo de RCP, con el que obtuvieron dos productos de amplificación: 700 pb (Holandés) y 1 600 pb (Americano). Se piensa que el *tet-M* tipo Holandés pudo originarse desde un evento de recombinación entre el tipo Americano y el plasmidio conjugativo (24,5 MDa) de *N. gonorrhoeae* (Gascoyne-Binzi *et al.*, 1993).

En nuestras cepas de estudio predominó el tipo Americano para un 82,7% de los 58 aislamientos con alto nivel de resistencia a la tetraciclina. En un estudio de 518 cepas TRNG aisladas entre 1988 y 1995 en Inglaterra, el 82% de las cepas que contribuyeron a infecciones gonocócicas en dicho país mostraron el determinante *tet-M* tipo Americano, sin embargo, más del 90% y el 36% de las cepas originales de África y el Caribe exhibieron el *tet-M* tipo Americano y Holandés, respectivamente. El total de las cepas provenientes del Lejano Oriente mostraron el tipo *tet-M* Holandés (Turner *et al.*, 1999). En otro estudio realizado en este mismo país (Inglaterra 1992-1998),

todas las cepas TRNG originales de América del Sur portaban el determinante *tet-M* tipo Holandés, mientras que nuevamente predominó el tipo Americano en las autóctonas.

La distribución de los aislamientos TRNG es bastante homogénea en el mundo, sin embargo, los informes analizados anteriormente demuestran que existen diferencias según el tipo de determinante *tet-M*. En Cuba predomina el tipo Americano como en América del Norte y algunos países de Europa y África; sin embargo, en varios países de la región Caribeña (como Jamaica) es más frecuente el tipo Holandés (Dutch) (Turner *et al.*, 1999).

Es muy posible que en Cuba la circulación de cepas de *N. gonorrhoeae* con altos niveles de resistencia a la penicilina y tetraciclina es actualmente endémica.

Algunos de los elementos que contribuyen al planteamiento de esta hipótesis han sido manejados en la discusión de este trabajo y podríamos resumirlos como sigue:

1. El tratamiento antimicrobiano constituye un elemento esencial en la estrategia de control de la enfermedad gonocócica.
2. El gonococo ha mostrado una gran capacidad de evolución y adaptación en su medio ambiente, desarrollando con facilidad resistencia a diferentes antimicrobianos a través del intercambio de material genético con microorganismos de su especie y especies relacionadas dentro o no de su género.
3. El programa de control de la enfermedad gonocócica en Cuba ha mantenido durante tres décadas a la penicilina y tetraciclina como primera y segunda alternativas de tratamiento de la gonorrea, sin un monitoreo y vigilancia sistemática de la resistencia a estas drogas. Tal hecho podría ejercer una presión selectiva y es posible que seleccione y determine la incidencia y prevalencia de una población microbiana resistente.
4. El alto nivel de resistencia a la penicilina y tetraciclina es de origen plasmídico; este tipo de resistencia se disemina con mayor rapidez que el tipo cromosomal.
5. Los estudios de la susceptibilidad antimicrobiana realizados en nuestro medio, aunque puntuales y esporádicos, demuestran un incremento progresivo tanto del número de cepas resistentes como de los niveles de CIM a la penicilina y tetraciclina. Sin obviar que el número de

cepas de gonococo tratado en tales publicaciones es reducido y no es representativo del número de infecciones que se notificaron para cada período de tiempo estudiado.

V.8. Epidemiología molecular

Debido a que las cepas PP/TRNG, PPNG y TRNG se han hecho altamente endémicas en muchas áreas geográficas del mundo, hoy es necesario contar con métodos de caracterización que permitan discriminar entre esta clase de población de gonococos, con el fin de esclarecer su comportamiento epidemiológico.

Un análisis general de los resultados permite observar, independientemente de las clases de susceptibilidad definidas, que el auxotipo prototrófico fue el prevalente en ambas clases de aislamientos: productores y no productores de penicilinas, siendo mayor en el primero (45 de 51 para el 88,2%) que en el segundo (19 de las 40 para el 47,5%). Estos datos coinciden con los encontrados por Dillon JR (1990) en 1989, donde el 83,3% de las PPNG mostraron el auxotipo prototrófico, lo que sugiere una estabilidad del auxotipo que mayormente circula en nuestro país desde ese año.

Los auxotipos proto y Pro⁻ acontecen para la mayoría de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* en todo el mundo (Knapp *et al.*, 1978; Plummer *et al.*, 1985). En el presente estudio se reveló que los auxotipos Proto y Pro⁻ fueron los más frecuentes para el 70,3 y 15,4% respectivamente. Lind y *et al.* en Dakar, Senegal, entre 1982-1986 (Lind *et al.*, 1991) reportaron estos mismos auxotipos como predominantes (proto 53% y Pro⁻ 28%).

La correlación del auxotipo con las categorías de susceptibilidad definidas en nuestra investigación demostró que el auxotipo prototrófico prevaleció en el 91,1% de las cepas PP/TRNG, en el 66,7% de las cepas PPNG y en el 55,6% de las cepas No-PP/TRNG (Tabla 10). Se encontró también que en el grupo de las cepas productoras de penicilinas (n=51) existía una importante relación entre cepas proto y el plasmidio Africano de 3,2 MDa. (Tabla 10), hecho descrito también por otros autores (van Klingeren *et al.*, 1985).

Existen pocas publicaciones acerca de la relación entre la distribución de valores de CIM y auxotipos de *N. gonorrhoeae* (Steward y Hendry, 1979). En general los aislamientos que requieren prolina son menos susceptibles a los antimicrobianos que los aislamientos prototróficos (van

Klingeren *et al.*, 1985). Tal afirmación se corresponde con el siguiente hallazgo en nuestras cepas de estudio: el 100% de las cepas prolina dependientes mostraron susceptibilidad intermedia y/o resistencia, ya sea a la penicilina o la tetraciclina (datos no mostrados).

En relación con la distribución de aislamientos por serogrupos, el haber encontrado un predominio del serogrupo WI (63,7%) sobre el serogrupo WII/III 36,3% (Tabla 10) concuerda con un estudio de 116 aislamientos consecutivos realizado en el Centro de Enfermedades de Transmisión Sexual en Sevilla, España (Palomares *et al.*, 1990).

La técnica de auxotipo está ampliamente difundida por su utilidad en la discriminación de cepas de *N. gonorrhoeae*, sin embargo, solamente 4 de los 35 tipos descritos son comunes en el medio ambiente, y la gran variedad de patrones de susceptibilidad probable para cada auxotipo sugiere la necesidad de emplear métodos adicionales de caracterización (Knapp, 1988). Investigaciones epidemiológicas se han desarrollado con la determinación del serogrupo y serovar como únicos métodos, pero desventajas similares a aquellas descritas para auxotipo se han planteado (Easmon y Ison, 1987; Knapp, 1988). La combinación de las clases de auxotipo/serovar, perfil plasmídico y tipo de determinante *tet-M* es empleada, hasta ahora, con éxito en los estudios epidemiológicos de la infección gonocócica y resistencia antimicrobiana.

Un propósito interesante en el presente estudio fue conocer la distribución de las clases de A/S en las cepas estudiadas, y, por tanto, su nivel de participación en la transmisión de la enfermedad gonocócica. En las cepas estudiadas se encontraron 21 clases de A/S, mostrando una diversidad muy inferior a la encontrada en cepas de Holanda para un período de tiempo estudiado similar (1988-1993), donde se hallaron 123 clases de A/S. A pesar de esto fue muy evidente el predominio y estabilidad de algunas clases de A/S como proto/IB-1 y proto/IB-3 en este último estudio, mientras que muchas otras clases de A/S fueron encontradas transitoriamente y hubo un influjo mantenido de nuevas cepas durante tal período (van Duynhoven, 1999). En Inglaterra (1992-1998) se hallaron como clases de A/S más prevalentes la Prolina/IA-6 (14.1%) y la prototrófica/IA-6 (11.5%) (Beattie *et al.*, 1999). De la misma manera, en nuestro trabajo dominaron un limitado número de clases de A/S (proto/IA-6; P-/IA-6; proto/IB-1) sobre las 18 encontradas (Tabla 11).

La combinación de auxotipo/serovar y perfil plasmídico han sido útiles en investigaciones epidemiológicas: siguiendo el comportamiento de una epidemia, estableciendo la posible relación

entre grupos con enfermedades de transmisión sexual (por ejemplo la gonorrea), definición de fracaso terapéutico y reinfección, estableciendo correlación de estos marcadores con manifestaciones clínicas y determinado patrón de susceptibilidad antimicrobiana, y para conocer la distribución de los aislamientos y cambios de sus características en áreas geográficas y en el tiempo (van Duynhoven, 1999). Sin embargo, bajo muchas circunstancias puede ser útil y necesaria una discriminación adicional, ya que clases de A/S pueden incluir más de un genotipo y ser un pequeño número de clases de A/S las que circulan en determinado medio ambiente. La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) satisface, con gran expectativa, esta necesidad (Xia *et al.*, 1995).

Se identificaron 17 aislamientos con la misma combinación de patrones de macrorrestricción obtenidos con ambas enzimas (*NbeI/SpeI*) (**cluster I**): 16 cepas exhibieron el fenotipo mayor **I** y una resultó ser diferente solo por la ausencia del plasmidio de 3,2 MDa en su perfil plasmídico (2,6-25,2) (Tabla 10). A pesar de ello decidimos incluirla en dicho cluster. El factor azar y/o condicional en la adquisición o pérdida de un elemento genético extracromosomal como el plasmidio de 3,2 MDa no determina en el perfil genómico del microorganismo por lo que no sugiere que la identidad de patrones de PFGE con el resto de los aislamientos de este cluster pueda deberse a insuficiente discriminación de la técnica.

En el fenotipo **II**, el cual estuvo compuesto por 7 de los 13 aislamientos TRNG, encontramos tres cepas con la combinación de patrones PFGE (*NbeI/SpeI*) X, 3 con la combinación XI y 1 con la XII. Quizá hubiera sido posible encontrar un mayor número de aislamientos compartiendo alguna combinación de patrones y, por tanto, "clusters" mayores dentro de dicho fenotipo, si la muestra de este estudio hubiera tenido un mayor tamaño y alcance en su representatividad. Las cepas con las combinaciones de patrones (*NbeI/SpeI*) X y XI fueron originales de Ciudad de la Habana.

Fueron notables 4 aislamientos con el fenotipo mayor **III**, pertenecientes al "cluster" IV; todos fueron aislados en la provincia de Santiago de Cuba y compartieron la combinación de patrones PFGE (*NbeI/SpeI*) XIII.

Nuestra investigación hace un esfuerzo por identificar cepas endémicas que pudieran ser indistinguibles o estar estrechamente relacionadas desde el punto de vista genético, según los métodos de tipificación y subtipificación empleados, pero que debido a que éstas han sido colectadas desde áreas distantes y aisladas de pacientes temporalmente no asociados, no es posible

demostrar o afirmar una relación epidemiológica directa o indirecta entre ellas.

Habíamos sugerido la hipótesis de que en Cuba el alto nivel de resistencia a la penicilina y la tetraciclina (PP/TRNG) tenían un comportamiento endémico e igualmente esperábamos encontrar que el grupo principal de la transmisión de la enfermedad gonocócica en nuestro medio estuviera contemplado en gonococos con esta categoría de susceptibilidad antimicrobiana. Los diversos marcadores epidemiológicos empleados en este estudio (los más recomendados en el discurso contemporáneo de este campo de investigación) permitieron apoyar estas ideas al identificar que cepas procedentes de las tres regiones (Occidental, Central y Oriental) del país y aisladas en los años 1995, 1996 y 1997 contribuyeron a la incidencia dentro del **cluster I** (cepas PP/TRNG, con el perfil plasmídico 2,6-3,2-25,2, con el determinante *tet-M*, con la clase A/S proto/IA-6 y la combinación de patrones de PFGE *NheI/SpeI I*).

Figura 4. Distribución de aislamientos PP/TRNG pertenecientes al cluster I según áreas geográficas.

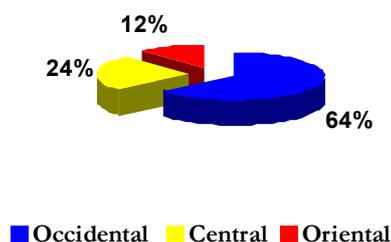
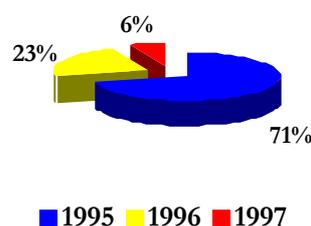


Figura 5. Distribución de aislamientos PP/TRNG pertenecientes al "cluster" I según años de estudio.



Estudios electroforéticos han revelado que la mayoría de las especies bacterianas tienen una estructura clonal, implicando tasas bajas de recombinación entre genes cromosomales en la naturaleza (O'Rourke y Spratt, 1994). La estructura clonal de la población bacteriana está caracterizada por la existencia de un fuerte desequilibrio de relación entre alelos, y por el aislamiento repetido de cepas con un mismo genotipo multilocus o tipo electroforético desde huéspedes no asociados temporal o geográficamente (Selander y Musser, 1990). Algunos estudios sugieren que la tasa de recombinación en poblaciones bacterianas puede ser muy variable, resultando en estructuras de población que van desde clonal hasta no clonal (Istock *et al.*, 1992; O'Rourke y Stevens, 1993).

Se ha demostrado que cepas de *N. gonorrhoeae* naturalmente transformables tienen una estructura de

población no-clonal, debido a una extensa recombinación en su medio ambiente (O'Rourke y Stevens, 1993).

Durante algún tiempo se consideró que el intercambio de material genético por recombinación entre poblaciones de microorganismos de estructura clonal era extremadamente raro, y que mutaciones puntuales constituían la fuente mayor de variación genética dentro de genes más estables y determinantes en la estructura de población (“house keeping genes”) (Selander y Musser, 1990). En años recientes este punto de vista ha cambiado y se cree que el desequilibrio de relación entre alelos de este tipo de población puede estar más bien determinado por un factor ecológico o geográfico dentro de dicha población o por las características del muestreo empleado (Edward *et al.*, 2001). Siendo estas consideraciones válidas para microorganismos de estructura de población clonal, se cree también, que la gran capacidad de recombinación en el gonococo puede dar lugar a clones debido a la fortuita asociación de alelos. Así, clones aparentes en poblaciones de gonococo pueden existir, lo cual es a primera vista contradictorio. Esto quiere decir que en una población no-clonal, aislamientos con un mismo genotipo no necesariamente tienen un reciente ancestro común (O'Rourke y Spratt, 1994).

A los efectos de nuestro análisis, los resultados obtenidos en el presente trabajo son válidos para plantear que aislamientos de gonococos distantes en el tiempo y área geográfica, con un fenotipo y patrón de macrorrestricción idéntico, no tienen probablemente un origen común, pero sí constituyen el grupo principal de microorganismos responsables de la transmisión de la enfermedad y qué prototipos pueden ser usados en investigaciones encaminadas a la obtención de vacunas y/o estudios de la patogenicidad del gonococo.

Resumiendo, es muy probable que la población de *N. gonorrhoeae* circulante en Cuba tenga una estructura básicamente asociada a los fenotipos mayores I, II y III anteriormente mencionados y que el **cluster I** constituya el grupo principal de cepas de *N. gonorrhoeae* responsable de la transmisión de la infección gonocócica en nuestro medio.

La incidencia de cepas de gonococo PP/TRNG podrían seguir un curso ascendente si se mantienen las estrategias actuales de tratamiento de la enfermedad gonocócica. En muchas áreas del mundo donde se han introducido nuevas drogas en el tratamiento como quinolonas y cefalosporinas, la vigilancia de la prevalencia de cepas PPNG y TRNG no tiene ya significación clínica. Sin embargo,

aún cuando se implementen nuevas y recomendadas alternativas de tratamiento de la gonorrea en Cuba, cepas identificadas en nuestro estudio con el fenotipo mayor **II** (TRNG, A/S Pro⁻, 2,6-25,2 MDa, *tet-M* tipo Dutch) podrían continuar siendo aisladas. En países como Estados Unidos y Holanda, a pesar de que la terapia con tetraciclina ha declinado de manera importante en el tratamiento de la infección gonocócica, continúan reportándose cepas TRNG a niveles considerables; esto puede estar relacionado con el uso de la tetraciclina en el manejo de otras ITS producidas por otros microorganismos como *Chlamydia*, y al hecho ya mencionado de la rápida diseminación del plasmidio de 25,2 MDa en una amplia gama de bacterias de diversos géneros de la flora del tracto genitourinario (Ison, 1996; Gascoyne *et al.*, 1991).

Teniendo en cuenta el comportamiento de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* desde muestras urogenitales, según los marcadores epidemiológicos empleados, convenimos con los siguientes comentarios.

La supervivencia global y continua de *N. gonorrhoeae* es inevitable debido a la aparente falta de inmunidad y natural y adquirida, el comportamiento social y sexual humano y a la alta frecuencia de infección asintomática (Cohen y Sparling, 1992). Sin embargo, la forma endémica de la enfermedad ha sido erradicada en Suecia, y muchos otros países desarrollados han reportado una dramática reducción en la incidencia (Kihlstrom y Danielsson, 1994).

Ciertamente, innovaciones radicales en el tratamiento no han tenido todo el crédito en estos sucesos recientes relacionados con el control de la enfermedad gonocócica, pues el empleo de drogas efectivas ha estado disponible en periodos tanto de incremento como de caída de la incidencia. Además, el tratamiento efectivo constituye un componente clave en el control y ha requerido cambios mayores con el desarrollo de la resistencia antimicrobiana en los últimos 40 años. Así, su eficacia se ha mantenido pero a un precio no alcanzable por todas las naciones y constituye solamente un elemento más en el control de la gonorrea (Tapsall, 2001).

Estos tratamientos corrientemente mencionados y recomendados (Moran y Levine, 1995) son costosos, sin embargo, el empleo de estas alternativas se impone y debemos encaminarnos a garantizar el uso adecuado de los antimicrobianos y a continuar con el trabajo de la vigilancia de la susceptibilidad antimicrobiana con vista a asegurar que los limitados recursos sean usados con la mayor eficacia y en el mejor contexto posible.

CAPÍTULO VI- CONCLUSIONES

1. El total de cepas estudiadas resultaron ser susceptibles a los antimicrobianos que recomienda actualmente la OMS para el tratamiento de la enfermedad gonocócica, lo que constituye una condición favorable para abordar una nueva política antimicrobiana.
2. La resistencia de alto nivel y de origen plasmídico a la penicilina y a la tetraciclina fue más frecuente que la de tipo cromosomal en las cepas de *N. gonorrhoeae* estudiadas.
3. El perfil de susceptibilidad a la penicilina y a la tetraciclina, así como la presencia del plasmidio de 3,2 MDa y el determinante *tet-M* Americano en nuestras cepas de estudio sugieren una posible relación con aislamientos que proceden del continente africano, región del mundo con los informes más altos de resistencia plasmídica a la penicilina y la tetraciclina.
4. El "cluster" I o prototipo, con un alto nivel de resistencia a la penicilina y a la tetraciclina, y pertenecientes a la clase de A/S prototrófica/IA-6 debe constituir uno de los principales grupos responsables de la transmisión de la enfermedad y diseminación de la resistencia antimicrobiana en Cuba.

CAPÍTULO VII- RECOMENDACIONES

- 1.- Revisar el Programa de Control de la gonorrea en Cuba sobre la base de los resultados obtenidos en nuestro trabajo, con el fin establecer una vigilancia sistemática de la susceptibilidad gonocócica antimicrobiana a nivel nacional, mediante el diseño y aplicación de métodos apropiados de muestreo que permitan monitorear cambios mayores en las poblaciones de gonococo.

- 2.- Continuar con el desarrollo de estudios de epidemiología molecular que permitan seguir la evolución y emergencia de poblaciones de *N. gonorrhoeae* resistentes a los antimicrobianos en uso o recientemente introducidos por el Programa de Control de la gonorrea en Cuba.

- 3.- Realizar estudios que permitan identificar mutaciones y/o determinantes genéticos responsables de la emergencia y diseminación de altos niveles de resistencia antimicrobiana en las cepas de *N. gonorrhoeae* que circulan en Cuba.

CAPÍTULO VIII- BIBLIOGRAFÍA

- Abeyewickereme I, Senaratne L, and Prithiviraj VB. Rapid emergence of 4-fluoroquinolone resistance with associated decline in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in Colombo, Sri Lanka. *Genitourin Med* 1996;72:302.
- Amies CR. A modified formula for preparation of Stuart's transport medium. *Can J Public Health* 1967;58:296-300.
- Anónimo. Status of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in Canada-1989. *Canada Diseases Weekly Report* 1991;17:49-50.
- Anónimo. Management of sexually transmitted diseases. World Health Organisation. WHO/UNAIDS 1997; WHO/GPA/94.1 Rev.1.
- Anónimo. Developing estimates for curable STDs in selected countries of the Western Pacific Region. WHO regional office for the Western Pacific STD HIV AIDS surveillance report 1998 a; 11:3-4.
- Anónimo. Sexually Transmitted Disease Surveillance, 1997. Division of STD Prevention, Center for Diseases Control and Prevention [CDC] 1998 b.
- Anónimo. La salud pública en Cuba. Hechos y cifras. Dirección nacional de estadística. MINSAP/1999 a;39-101.
- Anónimo. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections. Overview and estimates. World Health Organisation, Geneva 001:WHO/HIV _ IDS/2000; pp15-19.
- Armelagos GJ. The Viral Superhighway. *Sciences* 1998:24-9.
- Arvidson CG, Hirkpatrick R, Witkamp MT. *Neisseria gonorrhoeae* mutants altered in toxicity to human Fallopian tubes and molecular characterization of the genetic locus involved. *Infect Immun* 1999;67:643-652.
- Ashford WA, Golash RG, Hemming VG. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Lancet* 1976;ii:657-658.
- Australian gonococcal surveillance programme. Annual report of the Australian Surveillance Programme, 1998. *Comm Dis Intell* 1999;23:193-197.
- Australian gonococcal surveillance programme. Changing pattern of gonococcal infection in Australia, 1981-1987. *Med J Aust* 1988;149:609-612.

- Ayala P, Lin L, Hooper S, Fukuda M, So M. Infection of epithelial cells by pathogenic neisserias reduces the level of multiple lysosomal constituents. *Infect Immun* 1998;66:5001-5007.
- Backman M, Jacobson K, Ringertz S. The virgin population of *Neisseria gonorrhoeae* in Stockholm has decreased and antimicrobial resistance is increasing. *Genitourin Med* 1996;71:234-238.
- Barnes RC, Holmes KK. Epidemiology of gonorrhea: current perspectives. *Epidemiology Rev* 1984;6:1-28.
- Beattie T; Moyes A; Patrizio C; Young H. Subtyping of high-level plasmid-mediated tetracycline resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Scotland between 1992 and 1998. *Int J STD AIDS* 1999;10(10):646-51.
- Behr W, Gotschlich EC, Hitchcock. The virulence-associated gonococcal H.8 gene encodes 14 tandemly repeated pentapeptides. *Mol Microbiol* 1989;3(1):49-45.
- Benenson AS. Editor. El control de las enfermedades transmisibles en el hombre. Pub Cient No. 538. Organización Panamericana de la Salud 1992:295-299.
- Bhalla P, Sethi K, Reddy BSN, Mathur MD. Antimicrobial susceptibility and plasmid profile of *Neisseria gonorrhoeae* in India [New Delhi] *Sex Transm Dis* 1998;74:210-212.
- Bhuiyan BU, Rahman M, Miah MRA. Antimicrobial susceptibilities and plasmid contents of *Neisseria gonorrhoeae* isolated from commercial workers in Dhaka, Bangladesh: emergence of high-level resistance to ciprofloxacin. *J Clin Microbiol* 1999;37:1130-1136.
- Blake MS, Gotschlich EC. Functional and immunogenic properties of pathogenic *Neisseria* surface proteins. En: Inouye M, editores. *Bacterial membranes as model systems*. 2a, ed. New York: John Wiley & Sons; 1987. p. 377-399.
- Blake MS, Gotschlich EC. Gonococcal membrane proteins: speculation on their role in pathogenesis. *Progr Allergy* 1983;33:298-313.
- Bogaerts J, Dyck van E, Muskantabana B, Munyabikali JP, Tello MW. Auxotypes, serovars and trends of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in Kigali, Rwanda [1985-1993]. *Sex Transm Dis* 1998;74:205-209.
- Borthagaray G, Carballo S, Fulgueiras J, Barate M, Centron D, Ruiz A. Contenido plasmídico de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas en Uruguay. *Infect Microbiol Clin* 1990;2:28-30.
-

- Boslego JW, Tramont EC, Takafuji ET, Diniega BM, Mitchell BS, Small JW, *et al.* Effect of spectinomycin use on the prevalence of spectinomycin-resistant and of penicillinase-producing producing *Neisseria gonorrhoeae*. N Engl J Med 1987;317:272-278.
- Bovre K. Family VIII. Neisseriaceae Prevot. En: Krieg NR, editores. Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1. 5a. Ed. Baltimore: The Willias & Wilkims Co., 1984. p. 288-309.
- Brooks GF. Pathogenesis and immunobiology of gonococcal infection. En: Brooks GF, Donegan EA editores. Gonococcal infections. 1a. Ed. London: Edward Arnold; 1985. p. 51-82.
- Brunham RC, Nagelkerke NJD, Plummer FA, Stephens RS. Bacterial antigenic variation, host immune response, and pathogen-host coevolution. Infect Immun 1993;61:2273-2276.
- Buchanan TM, Hildebrandt JF. Antigen specific serotyping of *Neisseria gonorrhoeae*: characterization based upon principal outer membrane protein. Infect Immun 1981; 32:985-94.
- Bygdeman S. Polyclonal and monoclonal antibodies applied to the epidemiology of gonococcal infection. En: Young H, McMillan editores. Immunological diagnosis of sexually transmitted diseases. New York: Marcel Dekker; 1988. p. 117-165.
- Bygdeman SM, Mardh P-A, Sandstrom EG. Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to rifamocim and thiamphenicol: correlation with protein 1 antigenic determinants. Sex Transm Dis 1984; (11supl):366-370.
- Cannon JG, Back WJ, Nashamkin I, Stewart PW. Monoclonal antibody with recognises an outer membrane antigen common to the pathogenic *Neisseria* species but not to ost non-pathogenic *Neisseria* species. Infect Immun 1984;43:994-999.
- Carifo K, Catlin BW. *Neisseria gonorrhoeae* auxotyping: differentiation of clinical isolates based on growth responses on chemically defined media. Appl Microbiol 1973; 26:223-230.
- Carlin EM, Hammond JA, Boag FC, *et al.* Inoculation of culture plates: straightforward or is it. Int J STD & AIDS 1997;8:278-279.
- Carne CA, Hammond JA, Pearce F *et al.* Prevelence of antibodies to human immunodeficiency virus, gonorrhoea rates, and changed sexual behaviour in homosexual men in London. Lancet 1987;1:656-688.
- Castro I, Bergeron MG, Chamberland S. Characterization of multiresistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Nicaragua. Sex Transm Dis 1993;20:314-320.
- Catchpole MA. The role of epidemiology and surveillance systems in the control of sexually trnsmitted diseases. Genitourin Med 1996;72:321-329.

- Catlin BW, Nash Eh. Arginine biosynthesis in gonococci isolated from patients. In: Brooks GF, Gotschlich EC, Holmes KK, Sawyer WD, Youn FE editores. Immunobiology of *Neisseria gonorrhoeae*. . American Society for Microbiology: Washington, DC; 1973. p. 1-8.
- Centers for Disease Control. Tetracycline-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. Georgia. Pennsylvania. New Hampshire. MMWR 1985;34: 563-564.
- Center for Disease Control. Sentinel surveillance system for antimicrobial resistance in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. MMWR 1987; 36:585-593.
- Center for Disease Control. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*-United State, 1988 at 1989. MMWR MMWR 1990; 39:284-287.
- Center for Disease Control. Sexually Transmitted Diseases-Treatment Guidelines. MMWR 1993; (42 Supl):47-83.
- Center for Disease Control. Fluoroquinolone Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*, Hawaii, 1999, and decreased susceptibility to Azithromycin in *Neisseria gonorrhoeae* , Missouri, 1999. MMWR 2000;49:833-837.
- Chan RK, Thirumoorthy T. A decade of PPNG in Singapore. Ann Acad Med Singapore 1987; 16:639-644.
- Chang N, Taylor DE. Use of pulsed-field agarose gel electrophoresis to size genomes of Campylobacter species and to construct a *SalI* map of Campylobacter jejuni UA 580. J Bacteriol 1990;172:5211-5217.
- Chenia HY, Balkrishna P, Hoosen AA, Pillay D. Antibiotic susceptibility patterns and plasmid profile of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains in Durban, Sudáfrica, 1990-1990. Sex Transm Dis 1997;24:18-22.
- Chenia HY. Antibiotic susceptibility patterns and plasmid profiles of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains in Durban, South Africa, 1990-1991. Sex Transm Dis 1997;24: 18-22.
- Chu ML, Ho LJ, Lin HC, Wu YC. Epidemiology of penicillin-resistance *Neisseria gonorrhoeae* in Taiwan, 1960-1990. Clin Infect Dis 1992;14:450-457.
- Claeys G, Taelman H, Gichangi P, et al. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolated from men with urethritis in Kenya. Sex Transm Dis 1998;74:294-295.
- Clendennen TE III, Hames CS, Kees ES. "In vitro" antibiotic susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in the Philippines. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36:277-282.

- Cohen MS, Hoffman IF, Royce RA. Reduction of concentration of HIV-1 in semen after treatment of urethritis: implications for prevention of transmission of HIV-1. *Lancet* 1997;349:1848-1873.
- Cohen MS, Sparling PF. Mucosal infection with *Neisseria gonorrhoeae*. Bacterial adaptation and mucosal defenses. *J Clin Invest* 1992;89:1699-1705.
- Cohen MS. Sexually transmitted diseases enhance HIV transmission: no longer a hypothesis. *Lancet* 1998;351(Supl 3):5-7.
- Daly CC, Hoffman I, Hobbs M, et al. Development of an antimicrobial susceptibility surveillance system for *Neisseria gonorrhoeae* in Malawi: comparison of methods. *J Clin Microbiol* 1997;35:2985-2988.
- Dans P. Gonococcal anogenital infections. *Clin Obstet Gynecol* 1975;10:24-32.
- Del Love B, Finland M. Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to eleven antibiotics and sulfadiazine. *Arch Intern Med* 1955; 95:66-73.
- Delgado C, Romero F, Saez, N, Sotolongo F. Sensibilidad in vitro del gonococo a lapenicilina. *Rev. Cub. Hig. Epidemiol* 1989; 27:123-8.
- Deguchi T, Yasuda M, Nakano M, et al. Rapid detection of point mutations of the *Neisseria gonorrhoeae* gyr A gene associated with decreased susceptibilities to quinolones. *J Clin Microbiol* 1996;34:2255-2258.
- Deguchi T, Yasuda M, Nakano M, et al. Rapid screening of point mutations of the *Neisseria gonorrhoeae* parC gene associated with resistance to the quinolones. *J C Microbiol* 1997;35:948-950.
- Derrick JP, Urwin R, Suker J, Feavers IM, Maiden MJ. Structural and evolutionary inference from molecular vritionin *Neisseria* porins. *Infect Imm* 1999; 67: 2406-2413.
- Desai Pj, Morrinson JA, Fleming AF. Penicilinase producing *Neisseria gonorrhoeae* in Ndola, Zambia. *Transact Royal Soc Trop Med Hyg* 1990; 84:131.
- Dillon JR and Pauze M. Relationship between plasmid content and auxotype in *Neisseria gonorrhoeae* isolates. *Infect Imm* 1981,33:625-28.
- Dillon JA, Carballo M and Pauze M. Evaluation of eitgth methods for identification of *Neisseria* species: *Neisseria* Kiwk, RIM-N, Gonobio-Test, Minitex, Gonocek II, GonoGen, Phadebact Monoclonal GC OMNI test, and Syva Micro Trak test. *J Clin Microbiol* 1988;26:493-497.
- Dillon JR, Yeung K-H. B-lactamase plasmids and chromosomally mediated antibiotic resistance in pathogenic *Neisseria* species. *Clin Microbiol Rev* 1989; (Supl 2):S125-33.

- Dillon JA, Carballo M. Molecular epidemiology and novel combinations of auxotype, serovars and plasmid content in tetracycline-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Canada. *Can J Microbiol* 1990; 36: 64-7.
- Dillon JA, Li H. High burden of antibiotic resistant *N. gonorrhoeae* isolates in Americas and the Caribbean (1993-1995). Abstract O147 proceedings international congress of sexually transmitted diseases, Seville; 1997.
- Dillon JA, Rubabaza JP, Benzaken AS. Reduced susceptibility to azithromycin and high percentages of penicillin and tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* from Manaus, Brazil 1998. *Sex Transm Dis* 2001 a;28:521-526.
- Dillon JA, Li H, Sealy J. The Caribbean GASP Network and Prabhakar P. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from three Caribbean Countries- Trinidad, Guyana and St Vincent. *Sex Transm Dis* 2001 b;28:508-514.
- Djajakusumah T, Sugigdoadi S, Maheus A, Dyck van. Plasmid patterns and antimicrobial susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* in Bandung, Indonesia. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 1998;92:105-107.
- Dougherty TJ. Involvement of a change in penicillin target and peptidoglycan structure in low-level resistance to β -lactam antibiotics in *Neisseria gonorrhoeae*. *Molec Microbiol* 1985;28:90-95.
- Dunlop EMC. Gonorrhoea and the sulphonamide. *Br J Vener Dis* 1949; 25:81-3.
- Duynhoven van, YTPH. The epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in Europe. *Microbes and Infection* 1999;455-464.
- Dyck van E, Crabbe F, Vzila Ñl. Increasing resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in West and Central Africa. Consequences on therapy of gonococcal infection. *Sex Transm Dis* 1997;24:32-37.
- Easmon CSF, Ison CA. *Neisseria gonorrhoeae*: a versatile pathogen. *J Clin Pathol* 1987;40: 1088-1097.
- Edward JF, Holmes EC, Bessen DE, Chan MS, Day NPJ, Enright MC. Recombination within natural populations of pathogenic bacteria: Short-term empirical estimates and long-term phylogenetic consequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(1):182-187
- Ehret JM, Nims LJ, Judson FN. A clinical isolate of *Neisseria gonorrhoeae* with in vitro resistance to erythromycin and decreased susceptibility to azithromycin. *Sex Transm Dis* 1996;23:270-272.
- Elliott B, Brunham RC, Laga M et al. Maternal gonococcal infection as a preventable risk factor for low birth weight. *J Infect Dis* 1990;161:531-536.
- Embden van JDA, van Klingeren B, Dessens-Kroon M, van Wijngaarden LJ. Emergence in the

Netherlands of penicillinase-producing gonococci carrying “Africa” plasmid in combination with transfer plasmid. *Lancet* 1981;i:938.

- Evangelista AT, Beilstein HR, Cumite Embden JDA, van Klíngeren B, Dessens-Kroon M, van Wijngaarden LJ. Emergence in the Netherlands of penicillinase-producing gonococci carrying “Africa” plasmid in combination with transfer plasmid. *Lancet* 1981;i:938.
- ch 4A: Laboratory Diagnosis of Gonorrhoea. Abramson C. Coordinating editor. Washington D.C: American Society for Microbiology; 1993.
- Evans GL, Kopyta DL, Crouse K. New selective medium for for the isolation of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 1989;27:2471-2474.
- Falkow S, Elwell LP, de Graaf J. A possible model for the development of plasmid-mediated penicillin resistance in the gonococcus. En: Catterall RD, Nicols CS. editores. Sexually Transmitted Diseases: proceedings of a conference sponsored jointly by the Royal Society Medicine and Royal Society Medicine Foundation Inc: Winpole St. London WIM SAL; Jun 23-25, 1975. London Academic Press, 1976:120-123.
- Faruhi H, Kohmesvher R, MCKinney WP, Sparling PF. A community-based outbreak of infection with penicillin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* not producing penicillinase [chromosomally mediated resistance]. *N Engl J Med* 1985;313:607-611.
- Faur VC, Weisburd MH, Wilson ME, May PS. A new medium for the isolation of pathogenic *Neisseria* (NYC medium). I. Formulation and comparisons with standards media. *Health Lab Sci* 1973;10:44-52.
- Feavers IM, Maiden MCJ. A gonococcal *porA* pseudogen: implications for understanding the evolution and pathogenicity of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* 1998;30:647-656.
- Finland C, Robertsons H. Susceptibility of strains of *Neisseria gonorrhoeae* in Malawi. *Arch Vener Dis* 1992; 35:245-8.
- Fiorito S, Fernández C, Granados P, Galarza P. Primer informe en la República Argentina de resistencia a la penicilina en *Neisseria gonorrhoeae* mediada por el plásmido de 3.2 Mda. (Africano). *Infect Microbiol Clin* 1993;(4):10-6.
- Fiorito S, Galarza P, Pagarno I, et al. Antibiotic resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in Argentina. Abstract O143 Abstract monograph of the twelfth meeting of the international society for STD research, Seville, 1997.
- Fitzgerald M. Antibiotic treatment for gonorrhoea in the UK. *Genitouring Med* 1997;73:149.

- Fox KK, Knapp JS, Holmes KK, Judson FN, Thompson SE et al. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the United States 1988-1994; the emergence of decreased susceptibility to fluoroquinolone. *J Infect Dis* 1997;175:1396-1403.
- Fox KK, Whittington WL, Levine WC, Moran JS, Zaidi AA, Nakashima AK. Gonorrhoea in the United States, 1981-1996: demographic and geographic trends. *Sex Transm Dis* 1998, 25:386-393.
- Fox KK, Knapp JS. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Curr Opin Urol* 1999;9(1):65-70
- García PJ, Chapel S, Holmes KK. Sexually transmitted diseases in four Latin American countries over a six year period: 1989-1994. Abstract 68. Abstract monograph eleventh international society for STD research New Orleans, 1995.
- Gascoyne DM, Heritage J, Hawkey PM, Turner A and van Klingeren B. Molecular evolution of tetracycline-resistance plasmid carrying TetM found in *Neisseria gonorrhoeae* from different countries. *J Antim Chemotherapy* 1991; 28:173-83.
- Gascoyne-Binzi DM, Hawkey PM, Heritage J, Turner A, Nadarajah M. World-wide distribution of high level tetracycline-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Genitourin Med* 1992;68:277-278.
- Gascoyne-Binzi DM, Heritage J, Hawkey PM. Nucleotide sequences of the tetM genes from the American and Dutch type tetracycline resistance plasmid of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother* 1993;32:667-676.
- Genco CA, Knapp JS, Clark VL. Conjugation of plasmids of *Neisseria gonorrhoeae* to other *Neisseria* species: potential reservoirs for the β -lactamase plasmid. *J Infect Dis* 1984;150:397-401.
- Gerbase AC, Rowley JT, Heyman DHL, Berkley SFB, Piot P. Global prevalence and incidence estimates of selected curated STD. *Sex Transm Inf* 1998;74[Supl 1]:S12-S16.
- Ghys PD, Fransen K, Diallo MO, et al. The association between cervicovaginal HIV shedding, sexually transmitted diseases and immunosuppression in female sex workers in Abidjan, Cote d'Ivoire. *AIDS* 1997; 11: F85 - 93.
- Gill MJ, Simjee S, Al-Hattaway K, Robertson BD, Easmon CSF, Ison CA. Gonococcal resistance to β -lactams and tetracycline involves mutation in loop 3 of the porin encoded at the penB locus. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2799-2803.
- Goering RV. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal

restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. *Infect Con Hos Epidem* 1993;14:595-600.

- Gordon SM, Carlyn CJ, Doyle LJ, Knapp CC, Longworth DL, Hall GS, et al. The emergence of *Neisseria gonorrhoeae* with decreased susceptibility to ciprofloxacin in Cleveland, Ohio: epidemiology and risk factors. *Ann Intern Me.* 1996;125:465-70.
- Gotschlich EC. Development of a gonorrhoea vaccine: prospects strategies and tactics. *Bulletin of World Health Organization* 1984;65(5):671-680.
- Greeg CR, Johnson AP, Taylor-Robinson D, Melly A, Mcgee ZA. Hsot species-specific damage to oviduct mucosa by *Neisseria gonorrhoeae* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1981;34:1056-1058.
- Guthe T. Tendencias Epidemiológicas Mundiales de Sífilis y Blenorragia. *Boletín OPS* 1971;70(1):6-25.
- Gutman LT, Wilfert CM. Gonococcal diseases in infants and children, p 803-810. En Holmes KK, Mardh PA, Sparling PF, Weisner PJ, editores. *Sexually transmitted diseases*. 2a. ed. New York: McGraw-Hill Book Co., 1990. p. 457-72.
- Guymon LF, Sparling PF. Altered crystal violet permeability and lytic behaviour in antibiotic-resistant and sensitive mutant of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 1975;124:757-763.
- Hagman KE, Pan W, Spratt BG, Balthazar JT, Judd RC, Shafer WS. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the mtrCDE effux sistema. *Microbiology* 1995;141:611-622.
- Handsfield HH, Rice RJ, Roberts MC, Holmes KK. Localised outbreak of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. Paradigm for introduction ad spread of gonorrhoea in a community. *JAMA* 1989; 2357-61.
- Handsfield HH. *Neisseria gonorrhoeae*, p. 1613-31. En GL Mandel. RG Douglas and JE Bennett (ed.). *Principles and Practice of infectious diseases*. 3rd ed. Churchill Livingstone, New York. 1990.
- Handsfield HH, Dalu ZA, Martin DH, Douglas JM, McCarty JM, Schlossberg D, et al. Multicenter trial of single-dose azithromycin vs ceftriaxone in the treatment of uncomplicated gonorrhoea. *Sex Transm Dis* 1994;21:107-11.
- Handsfield HH, Whittington WL. Antibiotic-Resistant *Neisseria gonorrhoeae*: The Calm before Another Storm? *Ann Intern Med* 1996; 125:507-509.

- Handsfield HH, Whittongton WLH, Desmon S, Celum C, Krekeler B. Resurgent bacterial sexually transmitted disease among men who have sex with men - King County, Washington, 1997-1999. *MMWR* 1999;48:773-777.
- Hanenberg RS, Rojanapithayakorn V, Kunasol P, Sokal DS. Impact of Thailand's HIV-control programme as indicated by the decline of sexually transmitted diseases. *Lancet* 1994; 344:243-245.
- Henderson R. Enfermedades venéreas: un problema de salud nacional. *Clin Obstet Ginecol* 1975:211-221.
- Hendry AT, Stewart IO. Auxanographic and typing of *Neisseria gonorrhoeae*. *Can J Microbiol* 1979; 25:512-521.
- Ho RI, Lai P-H, Corman L, Ho J, Morse SA. Comparison of dihydrofolato reductases from trimethoprim-sulfonamide resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Transm Dis* 1978;5:43-50.
- Hoek JA van den, Griensven GJ, Couthino RA. Increase in unsafe homosexual behaviour. *Lancet* 1990;336:179-180.
- Holmes KK, Karney WW, Harnisch JP. Single-dose aqueous procaine penicillin G therapy for gonorrhoea: use of probenecid and cause of treatment failure. *J infect Dis* 1973; 127:455-460.
- Holmes KK.. Lower genital tract infections i women: cystitis, urethritis, vulvovaginitis and cervicitis,. En: Holmes KK, Mardh PA, Sparling PF, Wiesner PJ, editores. Sexually transmitted diseases, 2a. ed., New York: McGraw-Hill Book Co; 1990. p. 527-545.
- Holmes, Derrick JP, Urwin R, Suker J, Feavers IM, Maiden MJ. Structural and evolutionary inference from molecular variationing *Neisseria gonorrhoeae* porins. *Infect Immun* 1999;67:2406-2413.
- Hook, EW III, Holmes KK. Gonococcal infections. *Ann Intern Med* 1985; 102:229-43.
- Hook EWIII, Handsfield HH.. Gonococcal infection in the adult. p.149-165 In: KK Holmes, PA Mardh, PF Sparling and PJ Wiesner (ed). Sexually transmitted diseases, 2nd ed. McGraw-Hill Book Co., New York. 1990.
- Ison CA, Terry P, Bindayna K, Gill MJ, Adams J Woodford N. Tetracycline-resistance in gonococci in UK [letter]. *Lancet* 1988; 1:651-2.
- Ison CA, Bindyana KM, Woodford N, Gill MJ, Easmon CFS. Penicillin and cephalosporin resistance in gonococci. *Genitourin Med* 1990;66:351-356.
- Ison CA, Whitaker L, Renton A. Concordance of auxotype/serovar clases of *Neissera gonorrhoeae* between sexual contacts. *Epidemiol infect* 1992 a;109:265-271.

- Ison CA, Pepin J, Roope NS, Demba E, Secka O, Easmon CSF. The dominance of a multiresistant strain of *Neisseria gonorrhoeae* among prostitutes and STD patients in The Gambia. *Genitourin Med* 1992 b; 68:356-60.
- Ison CA. A one-year survey of *Neisseria gonorrhoeae* isolated from patients attending an East London genitourinary medicine clinic: antibiotic susceptibility patterns and patients' characteristics. *Genitourin Med* 1995 Feb; 71(1):13-7.
- Ison CA. Antimicrobial agents and gonorrhoea: therapeutic choice, resistance and susceptibility testing. *Genitourin Med* 1996; 72:253-57.
- Ison CA, Woodford PJ, Madders H, Claydon ME. Drift in susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to ciprofloxacin and emergence of therapeutic failure. *Sex Transm Dis* 1998 a;42:2919-2922.
- Ison CA, Dillon JA, Tapsall JW. The epidemiology of global antibiotic resistance among *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus ducreyi*. *Lancet* 1998 b; 351(Supl. 3):8-11.
- Istock CA, Duncan KE, Ferguson N, Zhou X. Sexuality in a natural population of bacteria-*Bacillus subtilis* challenges the clonal paradigm. *Mol Ecol* 1992;1:195-203.
- James JF, Swanson J. Studies on gonococcal infection. XIII Occurrence of color/opacity variants in clinical cultures. *Infect Immun* 1978;19:332-340.
- Jaffe HW, Bliddle JW, thornsberry C, Johnson RE, Kaufman RE, Reynolds GH, Wiesner PJ. National gonorrhea therapy monitoring study, In vitro antibiotic susceptibility and its correlation with treatment results. *New Eng J Med* 1976;294:5-9
- Jephcott AE, Reyn A, Birch A. *Neisseria gonorrhoeae* III. Demonstration of presumed appendages to cell from different colony types. *Acta Path Microbiol Scand* 1971;79:437-439.
- John RK. Control de la sífilis y la blenorragia en Cuba: un estudio. OPS/OMS/AMOR-0600/II Enfermedades de Transmisión Sexual 1978;pp 4.
- Johnson SR, Morse SA. Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: and mechanism of resistance. *Sexually Transmitted Dis* 1988;15:217-224.
- Johnston NA, Kolator B. Emergence in Britain of beta-lactamase-producing gonococci with new plasmid combination. *The Lancet* 1982;45-46.
- Joiner KA, Warren KA, Tam M, Frank MM. Monoclonal antibodies directed against gonococcal protein I vary in bactericidal activity. *J Immunol* 1985;134:3411-3419.
- Judd RC. Protein I: Structure, Function, and Genetics. *Clin Microbiol Rev* 1989:S41-S48.
- Kam KM, Lo KK, Ng KYH, Cheung MM. Rapid decline in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in Hong Kong associated with emerging 4-fluoroquinolone resistance. *Genitourin*

Med 1995;71:141-145.

- Kam, K. M., K. K. Lo, N. K. Y. Ho, and M. M. Cheung. Rapid decline in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in Hong Kong associated with emerging 4-fluoroquinolone resistance. *Genitourin Med* 1995;71:141-144.
- Kampmeier RH. Introduction of sulphonamide therapy for gonorrhoea. *Sex Trnas Dis* 1983; 10:81-4.
- Kaye D. Enfermedades causadas por Neisserias: enfermedad gonocócica. En: *Tratado de Medicina Interna de Cecil Loeb*. Tomo 1. Cap. 139. Editorial Iberoamericana 1985;385-389.
- Kihlstrom E, Danielsson D. Advances in biology, management and prevention of infections caused by *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Current Opinion in Infectious Diseases* 1994;7:25-33.
- Kihlstrom E, Danielsson D. Advances in biology, management and prevention of infection caused by *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Curr Opin Infect Dis* 1994;7:25-33.
- Kim SJ. The epidemiology of gonorrhoea in 16 cities of mainland China, 1987-1991. MPH treatise, University of Sidney, 1993.
- Klinger van B, Ansink-Schipper MC, Dessens-Kroon M, Verheuel M. Relationship between auxotype pattern and susceptibility to antibiotics in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antim Chemoth* 1985; 16: 143-7.
- Klinger van B, Dessens-Kroon M. Increase tetracycline resistance in gonococci in Netherlands [letter]. *Lancet* 1989; 2:1278.
- Knapp JS, Holmes KK. Disseminated gonococcal infections caused by *Neisseria gonorrhoeae* with unique nutritional requirements. *J Infect Dis* 1975;132:204-208.
- Knapp JS, Thornsberry C, Schoolnik GK, Wiesner PJ, Holmes KK, and The Cooperative Study Goup. Phenotypic and epidemiologic correlates of auxotype in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Infect Dis* 1978; 138:160-5.
- Knapp JS, Tam MR, Nowinski RC, Holmes KK, Sandstrom EG. Serological classification of *Neisseria gonorrhoeae* with use of monoclonal antibodies to gonococcal outer membrane protein I. *J Infect Dis* 1984; 150:44-8.
- Knaap JS, Bigdeman S, Sandstrom E, Holmes KK. Nomenclature for the serological classification of *Neisseria gonorrhoeae*. In: Schoolnik GK, Books GF, Falkow S, et al, eds. *The pathogenic Neisseriae*. American Society for Microbiology, Washington DC, 1985:4-5.

- Knapp JS, Holmes KK, Bonin P, Hook EW III. Epidemiology of gonorrhea: Distribution and Temporal Change in Auxotype/Serovar Classes of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Transm Dis* 1987; 14(1): 26-32.
- Knapp JS. Historical perspectives and identification of *Neisseria* and related species. *Clin Microbiol Rev* 1988 a;1:415-431.
- Knapp JS. Laboratory methods for detection and phenotypic characterization of *Neisseria gonorrhoeae* strains resistant to antimicrobial agents. *Sex Trans Dis* 1988 b; 15(4): 225-233.
- Knapp JS, Rice RJ. *Neisseria* and *Branhamella*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH editores. *Manual of Clinical Microbiology*. 6a. Ed, Washington DC: American Society for Microbiology; 1995.
- Knapp JS, Brathwaite AR, Hinds A, Duncan W, Rice RJ. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in Kingston, Jamaica, 1990-1991. *Sex Transm Dis* 1995; 22:155-159.
- Knapp JS, Zenilman JM, Biddle JW. Frequency and distribution in the United State of strains of *Neisseria gonorrhoeae* with plasmid-mediated, high-level resistance to tetracycline. *J Infect Dis* 1987; 155:819-22.
- Knapp JS, Hale JA, Neal SW, Wintersheid K, Rice RJ, Whittington WL, et al. Proposed criteria for interpretation of susceptibilities of strains of *Neisseria gonorrhoeae* to ciprofloxacin, ofloxacin, enoxacin, lomefloxacin, and norfloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39:2442-5.
- Knapp JS, Wongra C, Limpakarnjanarat K, Young NL, Parekh MC, Neal SW, Buatiang A *et al*. Antimicrobial susceptibility of strains of *Neisseria gonorrhoeae* in Bangkok, Thailand: 1994-1995. *Sex Transm Dis* 1997 a;24:142-148.
- Knapp, J. S., V. P. Mesola, S. W. Neal, T. E. Wi, C. Tuazon, R. Manalastas, P. L. Perine, and W. L. Whittington. Molecular epidemiology, in 1994, of *Neisseria gonorrhoeae* in Manila and Cebu City, Republic of the Philippines. *Sex Transm Dis* 1997 b;24:1-7.
- Kohl P. Epidemiology of sexually transmitted diseases: what does it tell us? *Sex Transm Dis* 1994;21(Supl 2):S81-S83.
- Koneman E, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Diagnostic Microbiology*. 5a. ed. Lippincott Philadelphia: New York; 1997. p.86.
- Koumans EH, Johnson RE, Knapp JS, St Louis ME. Laboratory testing for *Neisseria gonorrhoeae* by recently introduced nomenclature test: a performance review with clinical and public health consideration. *Clin Infect Dis* 1998;27:1171-1180.

- Kyriakis KP, Tzelepi E, Flemetakis A, Avgerinou H, Tzouvelekis LS, Frangouli E. Epidemiological aspects of male gonococcal infection in Greece. *Sex Transm Dis* 1999;26:43-48.
- Laar van de MJW, Pickering J, Hoek van den, Griensven van GJP, Couthio RA, Water van de HPA. Declining gonorrhoea rates in Netherlands, 1976-1988: consequences for the AIDS epidemic. *Genitourin Med* 1990;66:148-155.
- Laar van de MJW, Duynhoven van YTHP, Dessens M, Santen van M, Klingeren van B. Surveillance of antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the Netherlands, 1977-1995. *Genitourin Med* 1997;73:510-517.
- Laga M. Epidemiology and Control of Sexually Transmitted Diseases in Developing Countries. *Sex Transm Dis* 1994;2:45-49.
- Levine WC, Pope V, Bhoomkar A, et al. Increase in endocervical CD4 lymphocytes among women with non-ulcerative sexually transmitted diseases. *J Infect Dis* 1998;61:167-174.
- Lewis DA, Forster GE, Hooi AY, Goh BT, Wisdom AR. Gonococcal infection in east London: a two centre microbiological study. Liverpool (Abstract 85). Proceeding Medical Society for the Study of Venereal Diseases Spring Meeting, 1994.
- Lewis DA, Ison CA, Livermore DM, Chen HY, Wisdom AR. A one-year survey of *Neisseria gonorrhoeae* isolated from patients attending an east London genitourinary medicine clinic: antibiotic susceptibility patterns and patients' characteristics. *Genitourin Med* 1995;71:13-17.
- Li H, Dillon R. Utility of ribotyping, restriction endonuclease analysis and pulsed field gel electrophoresis to discriminate between isolates of *Neisseria gonorrhoeae* of serovar IA-2 which require arginine, hypoxanthine or uracil for growth. *J Med Microbiol* 1995;43:208-215.
- Lind I. In vitro susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to thiaphenicol: Results for selected groups of strains from different geographic areas and from different times. *Sex Transm Dis* 1984; Supl 11:360-3.
- Lind I. Present Status of Antimicrobial Resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. *Eur J Sex Transm* 1986;3:185-189.
- Lind I, Arborio M, Bentzon MW, Buisson Y, Guibourdenche M, Reimann K, et al. The epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Dakar, Senegal 1982-1986: antimicrobial resistance, auxotypes and plasmid profiles. *Genitourin Med* 1991; 67:107-13.
- Lind I. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Clin Infect Dis* 1997; 24(Supl 1):S93-7.
- Lin L, Ayala P, Larson M, et al. The *Neisseria* type 2 IgA1 protease cleaves LAMP1 and promotes survival of bacteria within epithelial cells. *Mol Microbiol* 1997;24:1083-1094.

- Llanes R, Sosa J, Guzmán D, Gutiérrez Y, Llop A, Ricardo O. *Neisseria gonorrhoeae* resistant to ciprofloxacin. First report in Cuba. *Sex Transm Dis* 2001;28(2):82-83.
- Maness MJ, Foster GC, Sparling PF. Ribosomal resistance to streptomycin and spectinomycin in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 1974;120:1293-1299.
- Mardh, P.-A. 1984. Bacteria, chlamydiae and mycoplasmas, p. 829-839. In: K.K Holmes, P.-A. Mardh, P.F. Sparling, and P. J. Wiesner (ed.), *Sexually transmitted diseases*. McGraw-Hill Book Co., New York.
- Martin JE, Jr, Jackson RL. A biological environment chamber for the culture of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Am Vener Dis Assoc* 1975;2:28-30.
- Martin JE, Lester A, Price EV. Comparative study of gonococcal susceptibility to penicillin in the United States, 1955-1969. *J Infect Dis* 1970; 122:459-61.
- Martin JE, Lester A. Transgrow, a medium for transport and growth of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *HSMHA Health Rep* 1971;86:30-33.
- Martin JE., Jr, Armstrong JH, Smith PB. New system for cultivation of *Neisseria gonorrhoeae*. *Appl. Microbiol* 1974;27:802-805.
- Martin JE., Jr, Lewis JS. Anisomycin: improved antimycotic activity in modified Thayer-Martin medium. *Public Health Lab* 1977;35:53-62.
- Martínez I. Sosa J. Valdés A et al. Medio para el transporte y conservación de cepas de *N. gonorrhoeae*. Registro de Patente 94/95. Clasificación internacional C12N1-04, 1998. Boletín de la Oficina Cubana de la Propiedad Intelectual . 6ta. Edición.
- Matulesy PF, Tirsá GM, Surjada CH, Forina MP. STDs prevalence among commercial sex workers [CSWs] and health facilities performance on STDs management in Indonesia. Abstract 322 of the Thirteenth meeting of the ISSTD, Denver, 1999, pg 184.
- McGee ZA, Melly MA, Gregg CR, et al. Virulent factor of gonococci: studies using human fallopian tube organ culture. In: Brooks GF, Gotschlich EC, Holmes KK, Sawyer WD, Young FE, eds. *Immunobiology of Neisseria gonorrhoeae*. Washington DC: American Society of Microbiology 1978:258-262.
- Mendiola J. *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae*. *Microbiología* 1989;18:215-228.
- Merianos A, Condon R, Tapsall J, Jayathissa S, Mulvey G, Lane J, Patel M, Rouse I. Epidemic gonococcal conjunctivitis in Central Australia. *Med J Aust* 1995;162:178-181.
- Mikrus FS, Molla T, Ersumo M, Henriksen TH, Klungseyr P, Hudson PJ, Kindan TT.

Community-wide outbreak of *Neisseria gonorrhoeae* conjunctivitis in Konso district, North Omo administrative region. *Ethiop Med J* 1991;29:(1):27-35.

- Ministerio de Salud Pública. Programa de Control de la Blenorragia en Cuba. Version actualizada, 1997 a.
- Ministerio de Salud Pública. Serie cronológica. Reporte de casos de gonorrea. 1997 b.
- Moran JS, Levine WC. Drugs Ckoice for treatment of Uncomplicate Gonococcal Infections. *Clin Infect Dis* 1995; 20(Supl):S47-65.
- Morse SA, Johnson SR, Biddle JW, Roberts MC. High-level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is result of acquisition of streptococcal tetM determinant. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;30: 664-670.
- Morse SA, Lysco PG, Mc Farland L, Knapp JS, Sandstrom E, Cirtchlow C, Holmes KK. Gonococcal strains from homosexual men have outer membranes with reduced permeability to hydrophobic molecules. *Infect Immun* 1982;37:432-438.
- Mostad SB, Overbaugh J, De Vange DM, et al. Hormonal contraception, vitamin a deficiency, and other risk factors for shedding of HIV- 1 infected cells from the cervix and vagina. *Lancet* 1997; 350: 922-927.
- Muller A, Gunther D, Dux F, Naumann M, Meyer TF, Rudel T. Neisserial porin (Por B) cause rapid calcium influx in target cells and induces apoptosis by the activation of cysteine proteases. *JEMBO* 1999;18:339-352.
- Murray BE. Can Antibiotic resistance be Controlled?. *N Eng J Med* 1994; 330(17):1229-30.
- Nassif X, So M. Interaction of oathigenic *Neisseria* with nonphagocytic cells. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:376-388.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved standards M100-S9. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Ninth informational Supplement; Wayne PA: National Commitee for Clinical Laboratory Standardss. 2000.
- Ng L-K, Dillon JR. Typing serovar, antibiogram, plasmid content, riboprobng, and isoenzyme typing to determine whether *Neisseria gonorrhoeae* isolates requiring proline, citruline and uracil for growth are clonal. *J Clin Microbiol* 1993; 31:1555-1561.
- Nissinen A, Jarvien H, Liimatainen O, Jahcola M, Huovien P. Antimicrobiaql resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in Finland, 1976 to 1995: The Finnish Study Group For Antimicrobial Resistance. *Sex Tarnsm Dis* 1997;24:576-581.
- O'Rourke M, Stevens E. Genetic structure of *Neisseria gonorrhoeae*: a non-clonal pathogen. *J Gen*

Microbiol 1993;139:2603-2611.

- O'Rourke M, Spratt BG. Further evidence for the non-clonal population structure of *Neisseria gonorrhoeae*: extensive genetic diversity within isolates of the same electrophoretic tupe. Microbiology 1994;140:1285-1290.
- Page-Shafer KA, McFarland W, Kohn R, Klausner J, Katz MH, Wohlfeiler D, et al. Increases in unsafe sex and rectal gonorrhoea among men who have sex with men - San Fransisco, California, 1994-1997. MMWR 1999;48:45-46.
- Pagotto F, Aman AT, Ng LK, Yeung KH, Brett M, Dillon JA. Sequence analysis of the family of penicillinase-producing plasmid of *Neisseria gonorrhoeae*. Plasmid 2000;43:24-34.
- Palomares JC, Lozano MC, Perea EJ. Antibiotic resistance, plasmid profile, auxotypes and serovars of *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Sevilla. Genitourin Med 1990;66:87-90.
- Pato-Mesola V, Klausner J, Aplasca MR, Manalastas R, Tuazón C, Whittington WL et al. Raapid emergence in Manila and Cebu, Philipines- 1994 and 1996-97 [abstarcts]. Proceeding 4th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Manila, Philipines, 25-29 October 1997.
- Peeling RW, Mabey DCW, Holmes KK. Molecular technics for HIV and STDs. Implications for research and disease control in the new milenium. En: Peeling RW, Sparling PF editores. Methods in molecular medicine. Sexually transmitted diseases methods and protocols. New Jersey: Humana press, totowa; 1999. p. 219-231.
- Pham-Kanter GBT, Steimberg MH, Ballar RC. Sexually transmitted diseases in South Africa. Genitourin Med 1996;72:160-170.
- Picard FJ and Dillon JR. Biochemical and genetic studies with arginine and proline auxotypes of *Neisseria ginorrhoeae*. Can J Microbiol 1989; 35:1069-75.
- Pillay M, Chenia NY, Hoosen AA, Pillay B, Pillay D. A novel β -lactamase plasmid in *Neisseria gonorrhoeae*. Med Sci Res 1997; 25:435-6.
- Piot P, Islam MQ. Sexually transmitted diseases in the 1990s. Global epidemiology and challenges for control. Sex Transm Dis 1994;21[Supl 2]:S7-S13.
- Plummer FA, D'Acosta LJ, Nsanze H, et al. Development of endemic penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in Kenya. En: Schoolnik GK, Brooks GF, Falkow S, et al., editores. The pathogenic Neisseriae. Washinton DC: American Society for Microbiology 1985:101-6.
- Puredawa E, Moon TD, Baigalmaa C, Davaajav K, Smith ML, Vermud SH. Rise in sexually transmitted diseases during democratization and economic crisis in Mongolia. Int J STD & AIDS 1997;8:398-401.

- Raddadi AA, Zimmo SK, Abdulla SA. In vitro activity of several antimicrobial agents against *Neisseria gonorrhoeae* in the western region of the Kingdom of Saudi Arabia. *Sex Transm Dis* 1998;74:294.
- Ramjee G, Karim SSA, Sturm AW. Sexually transmitted infection among sex workers in KwaZulu-Natal, South Africa. *Sex Transm Dis* 1998;25:346-349.
- Rein MF. Gonorrhoea. *Curr Opin Infect Dis* 1991;4:12-21.
- Reyn A, Korner B, Bentzon MW. Effect of penicillin, streptomycin ad tetracycline on *Neisseria gonorrhoeae* isolated in 1944 ad 1957. *Br J Vener Dis* 1958; 34:227-39.
- Reyn A. Drug susceptibility patterns of *Neisseria gonorrhoeae*: a world review. *Asian J Infect Dis* 1977;1:1-14.
- Rice RJ, Biddle JW, JeanLouis YA, DeWitt WE, Blount JH, Morse SA. Chromosomally mediated resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the United States: results of surveillance and reporting, 1985. p. 344-351.
- Roberts MC, Knapp JS. Host range of the conjugative 25.2-megadalton tetracycline resistance plasmid from *Neisseria gonorrhoeae*. *Agents Chemothar* 1988;32:488-491.
- Roberts MC, van Klingereren B, Knapp JS. tet-M and beta-Lactamase-Containing *Neisseria gonorrhoeae* (Tetracycline Resistant and Penicilinase producing) in The Netherlands. *AAC* 1988; 32: 158.
- Roberts MC. Plasmid of *Neisseria gonorrhoeae* and other *Neisseria* Species. *Clin Microbiol Rev* 1989; Apr (Supl):S18-S23.
- Roberts MC, Knapp JS. Transfer frequency of various 25.2 Mda tetracycline resistance palsmid in *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Transm Dis* 1989; 16: 91-4.
- Roberts MC, Chung WO, Roe D, Xia M, Marquez C, Borthagaray G, Whittington WL, Holmes KK. Erithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* and oral commensal *Neisseria* spp. Carry known rRNA methylase genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1367-1372.
- Robertson DH, Macmillan A, Young H. Gonorrea: etiología, patogenia y manifestaciones clínica. En: *Enfermedades de Transmisión Sexual: diagnóstico tratamiento, prevención y repercusión social*. Edit. Revolucionaria. 1984:156-71.
- Ross JDC. Systemic gonococcal infection. *Genitourin Med* 1996;72:404-407.
- Rothenberg RB, Voight R. Epidemiological aspects of control of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Transm Dis* 1988;15:211-215.

- Rowbotham JH, Tapsall JW, Plummer DC, Bodsworth NJ, MacDonald MA, Chambers IW, Kaldor JM. An outbreak of a penicillin-sensitive strains of gonorrhoea in Sidney men. *Genitourin Med* 1994;70:196-199.
- Sambrook J, Fritsch EF ad Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, 1989.
- Sandstrom EG, Danielson D. Serology of *Neisseria gonorrhoeae*. Classification by co-agglutination. *Acta Pathol Microbiol Scand B* 1980; 88:27-38.
- Sandstrom EG, Knapp JS, Buchanan TM. Serology of *Neisseria gonorrhoeae*: W-antigen serogrouping by coagglutination and protein I serotyping by enzyme-linked-immunosorbent assay both detect protein I antigens. *Infect Immun* 1982a; 35:229-39.
- Sandstrom EG, Chen KCS, Buchanan TM. Serology of *Neisseria gonorrhoeae*: co-agglutination serogroup WI ad WII/III correspond to different outer membrane protein I molecules. *Infect Immun* 1982b; 38:462-70.
- Sarafian SK, Knapp JS. Molecular epidemiology of gonorrhea. *Clin Microb Rev* 1989;2[Supl]:S49-S55.
- Sarafian SK, Rice RJ. Isolates of PPNG in Honolulu, Hawaii: 1982-1991. *Sex Transm Dis* 1992;21(6):332-337.
- Schoolnik GK, Tai JY, Rothbard J, Gotaschlich EC. A pilus peptide vaccine for the prevention of gonorrhoea. *Progr Allergy* 1983;33:314-331.
- Schoolnik GK, McGee Z. Gonococcal vaccine development strategies: summary of the recomendations of a National Institute of Helth Vaccine Panel. In: Schoolnik GK ed. *The pathogenic Neisseriae* Washington DC: American Society of Microbiology 1985:329-331.
- Selander RK, Musser JM. Population bacterial pathogenesis. In: *Molecular Basis of Bacterial* pp. 11-36. Edited by B.H. Iglewski & V.L. Clar Academic Press, 1990.
- Sherrar J, Balow D. Gonorrhoea in men: clínical and diagnostic aspects. *Genitourin Med* 1996;72:422-426.
- Slaney L, Chubb H, Ronald A, Brunham R. In-in vitro activity of azitromycin, erythromycin, ciprofloxacin and norfloxacin against *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus ducreyi* and *Chlamydia trachomatis*. *J Antimicrob Chemother* 1990;25[Supl A]:1-5.
- Sparling PF, Sarubi Jnr FA, Blackman E. Inheritance of low-level resistance to penicillin, tetracycline and chloranfenicol in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 1975;124:740-749.

- Sparling PF, Cannon JG, So M. Phase and antigenic variation of pili and outer membrane protein II of *Neisseria gonorrhoeae*. J Infect Dis 1986;153:196-201.
- Steingrimsdottir O, Olafsson JH, Thorarinnsson H, Ryan RW, Johnson RB, Tilton RC. Azithromycin in the treatment of sexually transmitted disease. J Antimicrob Chemother 1990;25[Supl A]:109-114.
- Steward O and Hendry A. Association between the Auxogroup of *Neisseria gonorrhoeae* and Minimal Inhibitory Concentration. of penicillin. Sex Transm Dis 1979; 247-52.
- Stuart RD, Toschach SR, Patsula TM. The problem of transport of specimens for culture of gonococci. Can J Public Health 1954; 45:73-83.
- Swanson J, Kraus SJ, Gottschlich EC. Studies on gonococcus infection-Pili and zones of adhesion: their relation to gonococcal growth patterns J Exp Med 1971;134:886.
- Tabrizi SN, Paterson BA, Fairley CK, Bowden FJ, Garland SM. Comparison of tampon and urine as self-administered methods of specimen collection in the detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Trichomonas vaginalis* in women. Int J STD AIDS 1998;9:347-349.
- Tam MR, Buchanan TM, Sandstrom EG. Serological classification of *Neisseria gonorrhoeae* with monoclonal antibodies. Infect Immun 1982; 36:1042-1053.
- Tapsall JW, Phillips EA, Schultz TR, et al. Strains characteristics and antibiotic susceptibility of isolates of *Neisseria gonorrhoeae* causing disseminated gonococcal infection in Australia. Int J STD & AIDS 1992;3:273-177.
- Tapsall JW., E. A. Phillips, T. R. Schultz, and C. Thacker. Quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Sydney, Australia, 1991-1995. Sex. Transm Dis 1996;23:425-428.
- Tapsall JW. Antimicrobial resistance in gonococci, WHO Western Pacific Region, 1996:the WHO Western Pacific Region Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme. Comm Dis Intell 1997;21:349-353.
- Tapsall JW, Limnios EA, Shultz TR. Continuing evolution of the patterns of quinolone resistance in *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Sydney, Australia. Sex Transm Dis 1998 a;25:415-417.
- Tapsall JW, Shultz TR, Limnios EA, Donovan B, Lum G, Mulhall BP. Failure of azithromycin therapy in gonorrhoea and disconnection with laboratory test parameters. Sex Transm Dis 1998 b;25(10):505-8.

- Tapsall J. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. WHO/CDS/CSR/2001.3. (en línea) 2001: (1 de diciembre del 2001). Disponible en URL:
http://www.who.int/emc-documents/antimicrobial_resistance/whocdscsrdrs20013c.html.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-2239.
- Trees DL, Spinola SM. Localization and immune response to the Lipip-Modified Azurin of the pathogenic *Neisseria*. *J Infect Dis* 1990;161:336-339.
- Turner A, Gough KR, Leeming JP. Molecular epidemiology of tetM genes in *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Transm Infect* 1999;75:60-66.
- Turner A, Gough KR, Leeming JP. Molecular epidemiology of tetM genes in *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Transm Infect* 1999;75(1):60-66.
- Vázquez JA. Infección gonocócica. Informe Laboratorio de ETS. Años 1983-1990. *Bol Epidemiol Sem Inst Salud Carlos III Esp* 1991. p. 1897.
- Venegas VS, Villafranca P, Madrid JP, Cosenza H, Bygderman S. Gonorrhoea and urogenital chlamydial infection in female prostitutes in Tegucigalpa, Honduras. *Int J STD AIDS* 1991;2:195-199.
- Viscidi RP, Demma JC, Gu J, Zenilman J. Comparison of sequencing of the *por* gene and typing of the *opa* gene for discrimination of *Neisseria gonorrhoeae* strains from sexual contact. *J Clin Microbiol* 2000;38(12):4430-4438.
- Wang S-P, Holmes KK, Knapp JS, Ott S, Kyzer D. Immunology classification of *Neisseria gonorrhoeae* with microimmunofluorescence. *J Immunol* 1977; 119:795-803.
- Watt PJ, Ward ME. Adherence of *Neisseria gonorrhoeae* and other species to mammalian cells. En: Beachey EH, editores. *Receptors and recognition* Vol B6, London: Chapman and Hall, 1980. p. 251-288.
- Waugh MA. Open study of the safety and efficacy of a single oral dose of azithromycin for the treatment of uncomplicated gonorrhoea in men and women. *J Anticub Chemother* 1994;25[Supl A]:193-198
- Waugh MA. Task force for the urgent response to the epidemics of sexually transmitted diseases in eastern Europe and central Asia. *Sex Transm Inf* 1999;75:72-73.

- Weller IVD, Hindley DJ, Adler MW, Meldrum JT. Gonorrhoea in homosexual men and media coverage of the acquired immune deficiency syndrome in London 1982-1983. *Br Med J* 1984;289:1041.
- West B, Changalucha J, Grosskurth H, Mayaud P, Gabone RM, Ka-Gina G, et al. Antimicrobial susceptibility, auxotypes and plasmid content of *Neisseria gonorrhoeae* in northern Tanzania: emergence of high level plasmid mediated tetracycline resistance. *Genitourin Med* 1995; 71(1): 9-12.
- Westrom L, Mardh PA. Pelvic inflammatory disease: epidemiology, diagnosis, clinical manifestations and sequelae. En: Holmes KK, Mardh A. editores. *International perspectives on neglected sexually transmitted diseases*. Washington DC: Hemisphere Publishing; 1983:235-50.
- Whittington WL, Desmon S, Kent C et al. Gonorrhoea among men who have sex with men selected sexually transmitted diseases clinics, 1993-1996. *MMWR* 1997;46:889-892.
- WHO Scientific Group. *Neisseria gonorrhoeae* and gonococcal infection. WHO Tech Rep Ser 1978; No.616.
- WHO Western Pacific Region Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme. Surveillance of antibiotic susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in the WHO Western Pacific Region 1992-1994. *Genitourin Med* 1997;73:355-361.
- WHO Western Pacific Region Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme. Surveillance of antibiotic susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in the WHO Western Pacific Region 1992-1994. *Genitourin Med* 1997;73:355-361.
- Wiesner PJ, Holmes KK, Sparling PF. Single doses of methaciline ad doxicycline for gonorrhoea: a cooperative study of the frequency ad cause of treatment failure. *J Infect Dis* 1973; 127:461-6.
- Willcox RR. A survey of problems in the antibiotic treatment of gonorrhoea with special reference to South-East Asia. *Br J Vener Dis* 1970;46:217-242.
- William L, Whittington AB, Knapp JS. Trends in Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to Antimicrobial Agents in Unite States. *Sex Transm Dis* 1988; 15(4): 202-10.
- Willigen van der AH, van der Hoek JC, Wagenvoort JH, van Vliet HJ, van Klingereren B, Schalla WO, et al. Comparative double-blind study of 200-mg and 400-mg enoxacin given orally in the treatment of acute uncomplicated urethral gonorrhea in males. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31:535-8.

- Wodfar N, Ison CA. The effects of media of antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*. J Antim Chemother 1998;22:463-471.
- Xia M. Detection of two groups of 25,2 MDa *tet-M* plasmid by polymerase chain reaction of the downstream region. Mol Cell Probes 1995;9:327-332.
- Xia M, Whittington WL, Holmes KK, Plummer FA, Roberts MC. Pulsed-field gel electrophoresis for genomic analysis of *Neisseria gonorrhoeae*. J Infect Dis 1995;171:455-458.
- Young H, Harris AB, Tapsall JW. Differentiation of gonococcal and non-gonococcal Neisseriae by the superoxol test. Br J Vener Dis 1984;60:87-89.
- Young H, Moyes A, McMillan A. Azithromycin and erythromycin resistant *Neisseria gonorrhoeae* following treatment with azithromycin. Int J STD & AIDS 1997;8:299-302.
- Zarantonelli L, Borthagaray G, Lee EH, Shafer WM. Decreased Azithromycin Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* Due to *mtrR* Mutations. Antim Agents Chemother 1999; 43:2468-2472.
- Zarantonelly L, Borthagaray G, Lee EH, Shafer WM. Decreased azithromycin susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* due to *mtrR* mutations. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:2468-2472.
- Zenilman JM, Bonneer M, Sharp KL, Rabb JA, Alexander ER. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in Dade county, Florida. Evidence of core group transmitters and the impact of illicit antibiotics. Sex Transm Dis 1988;15:45-50.
- Zubrzycki L. Non-culture tests for the diagnosis of gonorrhoea. Adv Exp Med Biol 1990;263:77-88.

CAPÍTULO IX- BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR

IX.1. Relacionadas con la investigación

- Llop A, Tamargo I, Ramírez M, Pérez M, Toraño G, Ramírez M, Bravo L, **Sosa J**, Llanes R, Montoro E, Bravo J, Borges M. Antimicrobial Resistance in the Americas: Magnitude and Containment of the Problem. PAHO/HCT/163/2000. Antimicrobial Resistance and Microbiological Surveillance in Cuba; pp. 111-118.
- Llop A, Tamargo I, Ramírez M, Pérez M, Toraño G, Ramírez M, Bravo L, **Sosa J**, Llanes R. Resistencia a los antimicrobianos y vigilancia microbiológica en Cuba. Rev Panamericana de Infectología, 1999 Vol 3 Supl 1: S33-40.
- **Sosa J**, Dillon JR, Llop A, Llanes R, Gutiérrez Y, Gutiérrez O, Guzmán D. Caracterización molecular de aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae*. Contribución a la epidemiología. Avances en Biotecnología Moderna. Libro de reportes cortos 1999; 5:V13. 1999.
- **Sosa J**, Llanes R, Rodríguez W, Gutiérrez Y, Guzmán D. Characterization of *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated from patient with conjunctivitis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95 (6):853-854).
- Llanes R, **Sosa J**, Martínez I. Detection of PPNG strains in Cuba. (1996-1998) Sex Transm Infect 2000; 76:58-66.
- **Sosa J**, Llop A, Llanes R, Martínez I, Sotolongo F. Characterization of *N. gonorrhoeae* strains isolated from a conjunctivitis outbreak. Gonococcal infection Immunity and Resistance. X Conference of Pathogenic *Neisseria*. Maryland. USA. 49-51. 1996.
- Llanes R, **Sosa J**, Martínez I, Llop A, Guzmán D, Gutiérrez O, Sotolongo F. Antimicrobial susceptibility of 42 *N. gonorrhoeae* strains isolated in 1995 in Cuba. X Conference of Pathogenic *Neisseria*. Maryland. USA. 49-51. 1996. 52-53.
- García LC, **Sosa J**, Llanes R, Valdivia A, Guzmán D, Gutiérrez O, Gutiérrez Y. Identificación de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Enferm Infecc y Microbiol 1998; Año 18, 18(5): 191-7.
- Martínez I, **Sosa J**, Valdés E, Llanes R, Palma S. Medio para el transporte y conservación de cepas de *N. gonorrhoeae*. Registro de Patente 94/95. Clasificación internacional C12N1-04, 1998. Esta patente queda publicada en el Boletín de la Oficina Cubana de la Propiedad

Intelectual en la 6ta. Edición.

- Llanes R, Acosta JC, **Sosa J**, Guzmán D, Gutiérrez O, Llop A. Susceptibilidad antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* por difusión con discos. *Rev Cubana Med Tropical* 1999; 51(3):116-119.
- García LC, Rodríguez A, Llanes R, **Sosa J**. Normalización de la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para el Diagnóstico de la Infección gonocócica en Muestras Genitales. *Avances en Biotecnología Moderna. Libro de reportes cortos* 1999; (5): D12.
- Llanes R, **Sosa J**, Guzmán D, Gutiérrez Y, Llop A, Ricardo O. *Neisseria gonorrhoeae* Resistant to Ciprofloxacin. *Sex Transm Dis* 2001; 28(2):82.

IX.2. No relacionadas con la investigación

- **Sosa J**, Llop A, Barrero E. Detection of Anti-pili Antibody of *Gonococcus* Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94 (3): 395.
- Martínez I, Patton AS, Sotolongo F, Llop A, **Sosa J**. Caracterización de cepas *N. meningitidis* pertenecientes al serogrupo B. *Acta Científica SVBE*, 3(1):31- 4, 1994.
- **Sosa J**, Patton AS, Martínez I. Estudio de plasmidios en cepas de *N. meningitidis* en cepas con sensibilidad intermedia a la penicilina. *Acta Científica SVBE*, 3(2):15- 8, 1995.
- Martínez I, Patton AS, Valdés E, Palma S, Llanes R, **Sosa J**, Llop A, Sotolongo F, Sampedro M. Estudio longitudinal de la sensibilidad por CMI en cepas de *Neisseria Meningitidis*. *Rev Mexicana de Enfermedades Infecciosas y Microbiol*, 16(2):74- 9, 1996.
- Patton A, Martínez I, Palma S, Valdés E, Llanes R, **Sosa J**, Martínez R, Sotolongo F, Sampedro M, Llop A, Gutiérrez O, Arnet A. Sensibilidad por CMI en cepas de *N. meningitidis*. *Boletín Sociedad Venezolana de Microbiología* 1994. 14(2):18.
- Martínez I, **Sosa J** et al. Estudio longitudinal de la Sensibilidad por CMI en cepas de *N. meningitidis*. *Rev Mexicana de Enf Infecc. Microb* 1995; 15 (5):355
- Martínez I, Palma S, Alfonso R, Valdés E, Llanes R, **Sosa J**. Susceptibilidad a la penicilina en cepas de *Neisseria meningitidis*. 1996 *VacciMonitor*, Año 6, No.4.
- Martínez I, Palma S, Alfonso R, Valdés A, Llanes R, **Sosa J**, Bravo J. Detección de cepas de *N. meningitidis* con susceptibilidad intermedia a la penicilina. *Enf Infecc. Microb*, 17 (1):23-6, 1997.
- Guzmán D, Llanes R, Martínez I, Valdés E, **Sosa J**. Primer Reporte de *Neisseria polysachareae* en Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 1999, Vol 51(3).

- **Sosa J**, Maestre JL, Martínez I, Patton AS, Suárez O, Llop A, Gutiérrez O, Fernández I . Estudio de ADN en cepas de *Neisseria meningitidis* por análisis de restricción. *Enferm Infecc y Microbiol* 1998; Año 18, 18(5): 198-202.
- Patton A, **Sosa J** et al. Estudio de la susceptibilidad de *Neisseria meningitidis* a diferentes antimicrobianos (enero 1990 - dic1992). *Boletín Soc Venez Microb* 15(1): 16-9.
- **Sosa J**, Llanes R, Llop A, Gutiérrez Y, Gutiérrez O, Guzmán D. Comportamiento del serosubtipo vacunal cubano en cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas de enfermos entre 1986-1996. *Avances en Biotecnología Moderna. Libro de reportes cortos* 1997; (4):V21
- **Sosa J**, Llanes R, Guzmán D, Quintana I, Flores M, Gutiérrez O. Typing and susceptibility Susceptibility to penicillin of *Neisseria meningitidis* Isolated from Patients in Cuba (1993-1999). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96 (4):523-526.
- Llanes R, Bravo L, Gutiérrez O, Sosa J. Tiras reactivas para el diagnóstico de actividad oxidasa en las bacterias. *Rev Cubana Med Trop* 2000;52(2):150-151.
- Pérez A, Dickinson F, Cinza Z, Ruíz A, Serrano T, **Sosa J**, González S, Gutiérrez Y, Nazábal C, Gutiérrez O, Guzmán D, Díaz M, Delgado M, Caballero E, Sardíñaz G, Alvarez A, Martín A, Guillén G, Silva R. Safety and preliminar immunogenicity of the recombinant outer membrane protein P64k of *Neisseria meningitidis* in human volunteers. *Biotechnol Appl Biochem* 2001;121-125.

IX.3 Presentación en eventos

Los resultados que se exponen en esta tesis han sido presentados en los siguientes eventos:

- 1- Tenth International Pathogenic Conference. Septiembre 8-13, 1996, Baltimore, Maryland, EUA.
 - Antimicrobial susceptibility of 42 *N. gonorrhoeae* strains isolated in 1995 in Cuba (Cartel).
 - Characterization of *N. gonorrhoeae* strains isolated from a conjunctivitis outbreak (Cartel).
- 2- V Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical. V Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. II Congreso Cubano de Medicina Tropical. Congreso 60 Aniversario del IPK, Ciudad de la Habana 1997.

- Estudio de la susceptibilidad antimicrobiana “in vitro” de *Neisseria gonorrhoeae* por el método de dilución en agar. Presentación oral.
 - Estudio de plasmidios en aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* procedentes de un brote de en adultos. Presentación oral
- 3- AMECA-CMA. Las Enfermedades de Transmisión Sexual y el Turismo. La Habana 1999.
- Epidemiología Molecular de aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* en Cuba. Panel- Presentación oral.
- 4- Biotecnología Habana '99. La Habana 1999.
- Caracterización Molecular de Aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae*. Contribución a la Epidemiología. Cartel.
- 5- XV Congreso Latinoamericano de Microbiología y XXXI Congreso Nacional de Microbiología. Mérida, Yucatán, México. 2000.
- Resistencia Bacteriana, la Epidemia Silente del Nuevo Milenio. Conferencia.
- 6- Twelfth International Pathogenic *Neisseria* Conference. 12-17 Noviembre 2000, Galveston, Texas, USA.
- Antibiotic susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* in Cuba (1995-1999). Cartel.
- 7- IX Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires, Argentina 2001.
- Susceptibilidad antimicrobiana y epidemiología molecular en cepas de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas en Cuba, 1995-1998.

CAPÍTULO X- ANEXO

I – Solución de aminoácidos:

Aminoácido	Concentración final. (Molar)	Cantidad (gramos)	Adicionar y disolver:	Agua Bidestilada estéril. (mL)
L - citrulina	0.21	1.84	Dos gotas de HCL 10N	50
L – ornitina	0.21	1.77		50
L - prolina	0.80	4.60		50
L-leucina	0.10	0.66		
L - metionina	0.10	0.75		50
Mezcla # 1				
Cisteina-HCL	75 mM	0.59	2 gotas de HCL	50
L-Cistina	25 mM	0.30	10 N	
Mezcla # 2				
L-isoleusina	25 mM	0.66		
L-valina	25 mM	0.59	1-2 gotas de HCL	200
L- treonina	25 mM	0.60	10 N	
Mezcla # 3				
L- serina	0.1 mM	1.06	1 gotas de HCL	
L- alanina	0.1 mM	0.90	10 N	100
L- histidina	0.1 mM	1.56		
Mezcla # 4				
L- lisina-HCL	50 mM	0.91	2 gotas de HCL 10 N o más, si necesario.	100
L- glutamina	50 mM	0.73		
L – triptófano	10 mM	0.20	2 gotas de HCL	100
L- fenilalanina	50 mM	0.83		
L- tirosina	50 mM	0.91	10 N o más, si necesario.	

II- Solución de sales:

Reactivo	Molaridad	g/L
NaCL	1.0 M	58.44
K ₂ SO ₄	50.0 mM	8.70
MgCl ₂ .6H ₂ O	20.0 mM	4.07
NH ₄ Cl	40.0 mM	2.15
EDTA disódico	0.1 mM	0.04

III- Otras soluciones:

a. Glutación espermina

1.54 g glutación, en forma reducida (0.1M)

1.74 g espermina-tetra HCL (0.1M)

Llevar a 50 mL con agua bidestilada estéril.

b. Uracilo (0.2 M)

1.12 g en 50 mL de NaOH 0.2N

c. Hipoxantina (0.14 M)

0.95 g en 50 mL de NaOH 0.1 N

d. Mezcla de vitamina (llevar hasta 50 ml de agua bidestilada estéril)

0.115 Co-carboxilasa (TPP-HCL) (5mM)

0.102 g Piridoxal HCL (10 mM)

0. 349 Colina- Cl (50mM)

e. Biotina (0.6 mM)

0.075 g en 50 mL de agua bidestilada estéril

f. CaCl₂.2H₂O (0.125 M)

0.92 g en 50 mL de agua bidestilada estéril, almacenar a 4°C

g. Citrato de amonio férrico

0.20 g 50 mL de agua bidestilada estéril, almacenar a 4°C

h. Fenilalanina (0.25 mM)

0.42 g, llevar a 25 mL con agua bidestilada estéril. Adicionar gotas de HCL si necesario

IV- Diluyente:

	Volumen (mL)	Peso (gramos)
Solución de sales	30.00	
Solución glicerol-lactato	1.50	
KH ₂ PO ₄		0.42
K ₂ HPO ₄		1.50

Se adicionó agua bidestilada estéril hasta 300 mL

Se ajustó pH a 6.9 ± 0.1

Finalmente se esterilizó por filtración.

Nota: Las soluciones a, b, c, d, e, f y g se almacenaban a -20° C. El resto de las soluciones incluyendo sales y diluyente se almacenaban a 4° C.

V- Preparación del medio líquido base a doble concentración:

	Volumen (mL)	Peso (g)
Solución de sales	240.0	
Agua bidestilada	720.0	
KH ₂ PO ₄ (10 mM)		3.5
K ₂ HPO ₄ (30 mM)		8.2
NaHCO ₃ (12 mM)		2.0
Acetato de sodio (25 mM)		6.8
Glucosa (28 mM)		10.0
Mezcla de vitaminas	1.2	
Glutación espermina	6.0	
Mezcla 2 de aminoácidos	24.0	
Mezcla 3 de aminoácidos	6.0	
Mezcla 4 de aminoácidos	12.0	
CaCl ₂	1.2	
Citrato de amonio férrico	1.2	
	Volumen (mL)	
Vitaminas: biotina	1.2	
Albúmina bovina libre de ácidos grasos	1.2	

Se ajustó volumen a 1200 ml y el pH a 7,2 con NaOH 10 N.

