

**Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”**  
**Centro de Investigación Diagnóstico y Referencia**  
**Departamento de Bacteriología - Micología**  
**Laboratorio Nacional de Referencia de *Neisserias* y *Helicobacter***

**Tesis para optar por el título de Máster en Bacteriología - Micología**



**Determinantes plasmídicos de resistencia a la tetraciclina en cepas de  
*Neisseria gonorrhoeae*. Cuba, 2009-2016**

**AUTORA:** Dra. Elizabeth Sanler Wong

**TUTORES:** Dr. Rafael Llanes Caballero, MSc  
Dra. Isabel Martínez Motas, DrC

**ASESOR:** Lic. Luis Enrique Jerez Puebla, MSc

**La Habana, 2018**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer de forma general a todas las personas que me apoyaron de cualquier forma en la realización de esta tesis.

Al Departamento de Bacteriología, a Onelkis, Oderay, Eduardo, Odisney y la querida profe Ana Margarita, por hacerme sentir parte de ustedes y brindarme los conocimientos en cada momento. A Yai, aun presente y enviando su buena energía.

Al Departamento de Virología por su contribución, a Javi, por tu auxilio en los tiempos difíciles.

Al Departamento de Docencia, siempre al tanto de nuestra formación.

Al Departamento de medios de cultivo, a Tony y Ana por su buena disposición.

Al departamento de Parasitología, colectivo de gran amabilidad. De manera especial a mi amigo Luisi, por tu entrega, perseverancia, bondad y sencillez, gracias por tu amistad y tu ayuda hasta el infinito.

A mis tutores Rafa e Isa, por la experiencia que transmiten y su presencia en los momentos cruciales.

A mis amigos de la residencia, cerca o lejos, los mantengo siempre presente.

A Lachi, siempre alegre y gentil.

A la gran voluntad y aliento de mi cuñada Cynthia y mi hermano Manu, mi suegra Miriam y mi padre, en el cuidado de mi pequeño Gabriel para la realización de la labor práctica.

A los demás integrantes de mi familia, por su colaboración.

A mi madre, por el espíritu de lucha que aún me falta alcanzar.

A Boris, compañero de mi alma, por la confianza en mis pasos de avance, por tu apoyo en las labores domésticas y el soporte de mis peores momentos.

Lyn, ahora junto a Gabi, sigues siendo la luz de mis días.

A todos, incluso a aquellos que dejé de mencionar, muchas gracias...

Elizabeth

## RESUMEN

Para confirmar la presencia de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* con alto nivel de resistencia frente a la tetraciclina (CIM  $\geq 8$  mg/L), mediada por la producción de plásmidos (TRNG), se necesita la identificación de los tipos de plásmidos Holandés o Americano portadores del determinante *Tet-M*, relacionados con elevada resistencia. El Laboratorio Nacional de Referencia de *Neisserias* y *Helicobacter* del Instituto Pedro Kourí realizó un estudio descriptivo de 34 cepas seleccionadas al azar, con perfiles de susceptibilidad a la tetraciclina desconocidos. Las cepas obtenidas entre 2009-2016 pertenecían a la colección de cultivos del laboratorio. La susceptibilidad antimicrobiana se determinó por el método de difusión con tiras de *E-test* (*bioMérieux*, Francia), descrito por el *Clinical Laboratory Standard International* (CLSI), 2015; la extracción del ADN plasmídico se efectuó mediante el estuche comercial *QIAamp Mini kit* (*Viajen*) mediante reacción en cadena de la polimerasa simple para detectar el tipo de determinante plasmídico *Tet-M*. La mayoría de las cepas seleccionadas (27/34) fueron resistentes a la tetraciclina, 20 expresaron alto nivel de resistencia, 7 una resistencia de bajo nivel (CIM 2-4  $\mu\text{g/mL}$ ), 4 mostraron susceptibilidad intermedia (CIM 0,5 - 1,0  $\mu\text{g/mL}$ ) y 3 fueron sensibles (CIM  $\leq 0,25$   $\mu\text{g/mL}$ ). Se identificaron plásmidos portadores del determinante *Tet-M* de tipo Holandés en 18 cepas (52,9%), con alto nivel de resistencia [16/20 cepas]. En las sensibles o con susceptibilidad intermedia, no se identificó este determinante. El estudio de los plásmidos de resistencia constituye una herramienta epidemiológica útil para monitorear el movimiento o importación de TRNG dentro de un país o región geográfica. El predominio de TRNG con presencia de plásmidos portadores del determinante *Tet-M* de tipo Holandés sugiere su diseminación en la población de cepas de *N. gonorrhoeae* circulantes en Cuba.

|                                                   |          |
|---------------------------------------------------|----------|
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b>                            | <b>1</b> |
| <b>II. OBJETIVOS</b>                              | <b>5</b> |
| <b>III. MARCO TEÓRICO</b>                         | <b>6</b> |
| III.1 Recuento histórico                          | 6        |
| III.2 Aspectos epidemiológicos                    | 6        |
| III.3 Aspectos microbiológicos                    | 8        |
| III.4 Características generales                   | 8        |
| III.5 Estructura antigénica                       | 9        |
| III.5.1 Pili o fimbrias                           | 9        |
| III.5.2 Proteínas de la membrana externa          | 9        |
| III.5.3 Lipooligosacáridos                        | 10       |
| III.5.4 Proteínas reguladoras del hierro          | 10       |
| III.5.5 Proteínas H8                              | 10       |
| III.5.6 IgA Proteasa                              | 11       |
| III.6 Patogenia                                   | 11       |
| III.7 Diagnóstico de la enfermedad gonocócica     | 12       |
| III.7.1 Diagnóstico clínico                       | 12       |
| III.7.2 Diagnóstico microbiológico                | 14       |
| III.7.2.1 Recolección de la muestra               | 14       |
| III.7.2.2 Transportación de las muestras clínicas | 14       |
| III.7.2.3 Examen microscópico directo             | 15       |
| III.7.2.4 Cultivo                                 | 15       |
| III.7.2.5 Crecimiento y morfología                | 15       |
| III.7.2.6 Identificación                          | 16       |

|                                                                                      |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| III.8 Susceptibilidad antimicrobiana                                                 | 17        |
| III.9 Caracterización de cepas resistentes                                           | 21        |
| <b>IV.MATERIALES Y MÉTODOS</b>                                                       | <b>23</b> |
| IV.1 Diseño general                                                                  | 23        |
| IV.2 Identificación y conservación de las cepas                                      | 23        |
| IV.3 Susceptibilidad antimicrobiana. Método de <i>E-test</i>                         | 23        |
| IV.4 Detección de resistencia plasmídica a la tetraciclina.                          | 24        |
| Determinante <i>Tet-M</i>                                                            |           |
| IV.4.1 Preparación del ADN                                                           | 24        |
| IV.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa para el determinante <i>Tet-M</i>         | 25        |
| IV.5 Análisis estadístico                                                            | 26        |
| <b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>                                                     | <b>27</b> |
| V.1 Susceptibilidad antimicrobiana de <i>N. gonorrhoeae</i> frente a la tetraciclina | 27        |
| V.2 Determinante <i>tet-M</i> en cepas de <i>N. gonorrhoeae</i>                      | 28        |
| <b>VI. CONCLUSIONES</b>                                                              | <b>34</b> |
| <b>VII. RECOMENDACIONES</b>                                                          | <b>35</b> |
| <b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                              | <b>36</b> |
| <b>IX. ANEXOS</b>                                                                    | <b>44</b> |

## I. INTRODUCCIÓN

La gonorrea o blenorragia es una infección de transmisión sexual (ITS) bacteriana producida por *Neisseria gonorrhoeae* que tiene una distribución mundial. Este microorganismo es un patógeno obligado del hombre, se conoce por la sinonimia de “gonococo” e infecta a las superficies mucosas del aparato genitourinario o puede tener otras localizaciones. Puede producir asimismo infecciones faríngeas, del recto, artritis, bacteriemia, enfermedad inflamatoria pélvica, así como infertilidad, entre otras. Las infecciones asintomáticas juegan un papel importante en la diseminación y persistencia de *N. gonorrhoeae* en el hospedero susceptible, en especial las mujeres (Marrazzo *et al.*, 2015).

La blenorragia tiene una amplia difusión en todos los estratos sociales, con una mayor incidencia en aquellos de bajo nivel socioeconómico. Cada año se notifican 78 millones de casos nuevos. Por tal motivo, esta ITS constituye un serio problema para la salud pública, a pesar de que su incidencia está subestimada por la falta de métodos diagnósticos confiables, el bajo registro y la notificación inadecuada de los casos (Newman *et al.*, 2015). En Cuba, la gonorrea es la ITS más notificada a las autoridades de salud, después de la sífilis (Anuario Estadístico de Salud, Minsap, 2017).

La susceptibilidad antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* evoluciona a través del tiempo y varía en dependencia del área geográfica de procedencia del aislado. El tratamiento de la blenorragia es complejo, por la habilidad del microorganismo para desarrollar resistencia progresiva a cada uno de los fármacos empleados en el manejo, que incluyen las penicilinas, la tetraciclina, las fluoroquinolonas, la azitromicina y más reciente las cefalosporinas de tercera generación (WHO, 2014; Unemo *et al.*, 2015).

La emergencia de cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a varios fármacos o superbacterias se debe al acceso no controlado y al uso excesivo de los antimicrobianos, que propician el surgimiento de mutaciones naturales dentro del material genético bacteriano, dada la elevada capacidad de adaptación del gonococo. Las medidas para el control de la gonorrea deben aplicarse de forma

coordinada, para evitar que la progresiva adquisición de resistencia antimicrobiana la convierta en una enfermedad de difícil control (Campos, 2012; WHO, 2016).

Existen dos mecanismos de resistencia antimicrobiana observados en *N.gonorrhoeae*: la resistencia cromosómica y la de tipo plasmídica; la primera se debe a mutaciones en genes específicos y es responsable de la resistencia a diversos fármacos: penicilina, tetraciclina, cefalosporinas, espectinomicina, azitromicina y quinolonas. Ciertos tipos de mutaciones cromosómicas pueden contribuir a la resistencia simultánea a varias clases de antimicrobianos (Bodoev *et al.*, 2015; Lourenco *et al.*, 2017). La otra forma de resistencia gonocócica está mediada por plásmidos, elementos extracromosómicos de ADN que codifican para la resistencia de alto nivel a la penicilina y la tetraciclina. En la actualidad se describen tres tipos de plásmidos conjugativos en *N. gonorrhoeae* (un plásmido de 24,5 MDa que no detectable y dos plásmidos conjugativos con un peso molecular de 25,2 MDa portadores del determinante de resistencia *Tet-M* que media el alto nivel de resistencia para la tetraciclina (Zheng *et. al*, 2015). La susceptibilidad a la penicilina puede afectarse por una  $\beta$  lactamasa plasmídica de tipo TEM-1, que puede estar presente en otros diferentes tipos de plásmidos con una frecuencia geográfica variable (CIM  $\geq 8$  mg/l) (Turner, 1999).

La tetraciclina se introdujo en la década de 1950 como una opción terapéutica para los pacientes con gonorrea alérgicos a la penicilina. Ese antimicrobiano afecta la síntesis proteica en la subunidad ribosomal 30s (Guerra y Vázquez, 2013). La disminución gradual de la sensibilidad o resistencia de bajo nivel a la tetraciclina es el resultado del efecto aditivo de múltiples mutaciones cromosómicas en los genes *rpsJ* S10 y *mtrR* que modifican la diana de acción del antimicrobiano. También se produce debido a la reducción de la permeabilidad que confiere la mutación en el gen *porB1b* (Bodoev *et al.*, 2015; Ilin *et al.*, 2008; Unemo y Shafer, 2014). Algunas de las mutaciones relacionadas con la resistencia a la penicilina (*penB* y *mtr*), confieren también resistencia a la tetraciclina. Además, la mutación V57M en la proteína ribosomal 10S es suficiente para elevar la concentración inhibitoria mínima (CIM) a la tetraciclina a  $\geq 2$   $\mu$ g/mL (Kubanov *et al.*, 2017; Lourenco *et. al*, 2017; Unemo *et.*

*al*, 2016), que es el punto de corte actual para determinar la resistencia a ese fármaco (CLSI, 2017)

Otras mutaciones en el gen *penB* producen alteraciones en una porina que ocasiona resistencia a varias familias de fármacos como las tetraciclinas y una disminución de la sensibilidad frente a las quinolonas. La hiperexpresión de la bomba de expulsión MtrCDE favorece la resistencia a las penicilinas, macrólidos, rifampicina, tetraciclinas y las quinolonas, y puede implicarse en la disminución de la sensibilidad a las cefalosporinas (Dillon y Parti, 2012; Kubanov *et al.*, 2017; Unemo *et al.*, 2011).

A pesar de su fiabilidad para tratar las infecciones gonocócicas, la disminución de la sensibilidad a las cefalosporinas de espectro extendido: cefixima y ceftriaxona se desarrolla y extiende en la actualidad. El mecanismo resulta de la combinación de los efectos de varias mutaciones genéticas en el gen *penA* que codifica para la proteína de unión a la penicilina (PBP2), el gen *penB* que afecta la entrada del antimicrobiano a través del canal de la proteína de membrana externa PorB 1b y *mtrR*, un represor del sistema transportador MtrCDE. Se describe también un *cassette* (mosaico *penA*), común en cepas de *N. gonorrhoeae* con susceptibilidad disminuida a la cefixima, cuya adquisición ocurre por la transferencia horizontal de ADN de otras neisserias, pertenecientes a la microbiota oral (Bolan *et al.*, 2012; Guerra *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2009).

La vigilancia microbiológica de la resistencia antimicrobiana resulta clave para el monitoreo de las tendencias locales, regionales e internacionales de la resistencia y provee información útil a los programas de control de enfermedades y para el desarrollo de las políticas de salud pública. La comparación entre la susceptibilidad a los antimicrobianos de los gonococos aislados en diferentes zonas geográficas proporciona una valiosa información sobre la distribución y diseminación temporal de las cepas resistentes. De esta forma, podrían anticiparse cambios oportunos en los tratamientos recomendados en el ámbito local (CDC, 2015).



El Laboratorio Nacional de Referencia de *Neisserias* Patógenas y *Helicobacter* (LNR-NH) del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” de Cuba, realiza, desde el año 1995, la vigilancia de la susceptibilidad antimicrobiana de *N.gonorrhoeae* procedentes de diferentes provincias. A pesar de que el número de aislados recibidos no es representativo de la situación existente en el país, la circulación de cepas con altos niveles de resistencia a la tetraciclina es elevada, solo superada por la resistencia a la ciprofloxacina (Llanes *et al*, comunicación personal, 2018; Thakur *et al.*, 2017).

Los estudios moleculares proporcionan un conocimiento de las bases genéticas de la resistencia a los antimicrobianos y complementan los resultados de las pruebas fenotípicas de susceptibilidad a los mismos (Unemo y Shafer, 2014). La identificación cepas de *N.gonorrhoeae* portadoras de plásmidos de resistencia a la penicilina y la tetraciclina constituye un método valioso en el monitoreo del movimiento o importación de cepas productoras de penicilinasa (PPNG) y con resistencia plasmídica a la tetraciclina (TRNG) dentro de una región geográfica (Zheng *et.al*, 2015).

La presente investigación propone la búsqueda del determinante de resistencia plasmídica a la tetraciclina, tipo Holandés y Americano en cepas de *N. gonorrhoeae* aisladas en Cuba, durante los últimos siete años (2009-2016). Si bien este antibiótico no se emplea en el tratamiento de la blenorragia, el estudio de la resistencia es un marcador epidemiológico de interés en este patógeno (Weston *et al.*,2017).

## II. OBJETIVOS

1. Identificar el tipo de determinante *Tet-M* plasmídico en cepas cubanas de *N.gonorrhoeae* seleccionadas.
2. Describir la presencia del determinante *Tet-M* según los patrones de susceptibilidad a la tetraciclina en las cepas de *N. gonorrhoeae* objeto de estudio.

### **III. MARCO TEÓRICO**

#### **III.1 Recuento histórico**

Las primeras referencias de la gonorrea datan del año 2637 a.C, descritas por el emperador chino Huang-ti, aunque en el año 1500 a.C. aparecen informes en el viejo testamento de la Biblia, Libro Levítico capítulo 15; el famoso médico griego Claudio Galeno acuña el término gonorrea en el año 130 a.C. El vocablo gonorrea deriva del griego antiguo “*gonos*” (semilla) y “*rhein*” (fluir) “salida de flujo”, por la impresión errónea de considerar a la secreción purulenta como una espermatorrea. La enfermedad tiene otras denominaciones populares como “clap”, “gota militar” y “gota del amanecer” (Hook *et al.*, 2008).

En tiempos modernos (1879), el médico alemán Albert Neisser, realiza por primera vez, la descripción de la morfología de la bacteria, aislada de muestras genitales obtenidas de pacientes adultos infectados y en los exudados conjuntivales de niños. Denominó a este microorganismo como *Micrococcus gonorrhoeae* (Hook *et al.*, 2008).

El aislamiento de este agente patógeno se realiza en 1882 por Leistikow y Loeffler; luego en 1885, Ernest Bumm lo cultiva y demuestra su relación etiológica con la gonorrea, mediante la inoculación de la bacteria en individuos voluntarios. En el mismo año, Trevisan emplea el nombre definitivo de *N. gonorrhoeae* y más tarde, las investigaciones del fisiólogo John Hunter, logran diferenciar la gonorrea de la sífilis (Hook *et al.*, 2008).

#### **III.2 Aspectos epidemiológicos**

Los casos de ITS en el mundo se calculan en 357 millones, estos predominan en adultos con edades comprendidas entre los 15 y los 49 años. En la actualidad, cada año se notifican alrededor de 78 millones de nuevas infecciones gonocócicas, una cifra que ha descendido respecto a las evaluaciones anteriores, pero con un resultado significativo mayor que los 62 millones de casos notificados por la OMS en 1995 (Newman *et al.*, 2015).

La notificación de casos de blenorragia difiere entre los diferentes países, pero siempre es más baja en las naciones desarrolladas, donde la incidencia representa un décimo de la notificada en los países en vías de desarrollo (Kirkcaldy *et al.*, 2016; WHO, 2012). En Estados Unidos, se estiman en 820 000 los casos nuevos cada año (CDC. 2015); en Europa en el año 2013, se notifican 50 001 casos, la mayoría del Reino Unido (32 377), seguido de Holanda (4 171), España (3 314), Hungría (1 526) y Portugal (116) (ECDE, 2015). En Brasil, la incidencia es de más de 1 millón de casos y cifras ligeramente inferiores se reportan en África, Asia y América Latina (Lourenco *et. al*, 2017).

En Cuba, desde 1970, la blenorragia constituye una enfermedad de declaración obligatoria (EDO) a las autoridades de salud pública. En 1981, surge el Programa Nacional de Prevención y Control de la Gonorrea, con el propósito de disminuir sus complicaciones, mediante un diagnóstico precoz y el tratamiento oportuno de los pacientes y sus contactos. En los últimos años, las tasas de incidencia anual de la gonorrea se mantienen altas, a pesar del subdiagnóstico y subregistro existentes en el país (Anuario Estadístico de Salud, Minsap, 2017, Plan Estratégico Nacional ITS en Cuba, 2013).

El riesgo de infección gonocócica difiere según el sexo del individuo, por ejemplo, la transmisión de una mujer infectada a su pareja masculina ocurre en alrededor de 20% por cada exposición y se incrementa al 60-80% después de cuatro exposiciones. Sin embargo, el riesgo de transmisión del hombre a la mujer (aunque está menos estudiado), es de aproximadamente 50% por cada contacto sexual y se incrementa a más de 90% después de tres exposiciones. La blenorragia se asocia con la transmisión de otras ITS y un mayor contagio con el VIH; esto último se atribuye al incremento del número de linfocitos TCD4, células dianas virales, en el exudado inflamatorio que acompaña a las ITS (Davey *et al.*, 2018; Fuertes de Vega *et al.*, 2018).

El elevado número de infecciones gonocócicas asintomáticas, sobre todo en las mujeres, el fracaso de los médicos y pacientes para reconocer los síntomas y las dificultades para realizar el diagnóstico de laboratorio dificultan el control de la blenorragia. Para revertir esta situación, se adoptan estrategias que aumentan

la oportunidad de ofrecer un tratamiento efectivo a estos pacientes, entre ellas está el manejo sintomático de los casos de ITS (WHO, 2012).

### **III.3 Aspectos microbiológicos**

Según la nueva clasificación de microorganismos basada en las secuencias genéticas del ARN ribosómico 16S, recogida en el manual de Bergey, *N. gonorrhoeae* pertenece al género *Neisseria*, ubicado en la clase  $\beta$  del *phylum* proteobacterias. Las bacterias pertenecientes a este *phylum* presentan una morfología, fisiología y metabolismo variable. La familia Neisseriaceae incluye a los géneros *Neisseria*, *Kingella*, *Eikenella*, *Simonsiella* y *Alysiella* (Adeolu y Gupta, 2013).

### **III.4 Características generales**

La especie *N.gonorrhoeae* está constituida por diplococos gramnegativos, inmóviles, no esporulados, con un diámetro aproximado entre 0,6 a 0,8  $\mu\text{m}$ . Las células tienen forma de riñón o grano de café. Al formarse en pares adyacentes, sus lados pueden observarse al microscopio como planos o cóncavos. Este microorganismo resulta sensible a la desecación, las temperaturas de refrigeración y los componentes tóxicos del medio, como ácidos grasos, sales y antisépticos. Resiste poco tiempo a la exposición al aire (de una a dos horas), por lo que su sobrevivencia es pobre fuera del ambiente natural. El metabolismo es aerobio, alcanza el crecimiento óptimo de 18-24 horas de incubación en medios enriquecidos, a una atmósfera con 5-10% de  $\text{CO}_2$ , una temperatura entre 35-37° C y un pH de 7,2-7,6. La bacteria elabora las enzimas oxidasa y catalasa, esenciales para la identificación de género. Degrada únicamente la glucosa, con producción de ácido, característica bioquímica que la distingue de otras especies del género *Neisseria* (Hook et al., 2008).

### III.5 Estructura antigénica

*Neisseria gonorrhoeae*, tiene habilidad para variar el conjunto antigénico de las moléculas expuestas en su superficie, principalmente los pili adhesivos y proteínas relacionadas con la opacidad (Hill *et al.*, 2016).

**III.5.1 Pili o fimbrias:** Son apéndices que emergen como proyecciones desde la superficie de la bacteria, están constituidos por subunidades proteicas o pilina. Constituyen un factor importante en la virulencia y su función principal es mediar la adhesión de la bacteria a las células del hospedero, especialmente a las microvellosidades del epitelio columnar. Los pili capacitan a la bacteria para vencer las fuerzas de repulsión electrostática de las células del hospedero. Además, le confieren una mayor resistencia a la fagocitosis. *N. gonorrhoeae* puede variar de fase, es decir, presentar formas con pili o sin ellos, proceso regulado desde el punto de vista genético. Los pili pueden presentar una importante variación antigénica, determinada por la inserción o delección de unos pocos residuos de aminoácidos y ocurre a nivel del extremo carboxiterminal de la pilina. Este proceso está controlado en el cromosoma bacteriano, por diversos genes. La porción variable, terminal, de la pilina es el blanco de la respuesta inmunitaria, por lo que, la variación antigénica a ese nivel representa un mecanismo de escape para evadir las defensas del hospedero (Hill *et al.*, 2016).

#### III.5.2 Proteínas de la membrana externa (PME)

Proteína Por I: parece intervenir en la fagocitosis, un paso importante en la patogenia de la gonorrea. A diferencia de las otras PME, por expresarse en forma constante, se utiliza como un sistema de tipificación bacteriana. Existen dos subclases de proteína I (IA y IB), que definen 24 y 32 serovares, respectivamente; cada aislamiento de gonococo expresa solo un tipo de PI mediante reacciones de aglutinación con anticuerpos monoclonales (Hill *et al.*, 2016).

Proteína II (Opa): es una familia de PME con una extensa variación antigénica, que no siempre se expresa. Desde el punto de vista funcional aumenta la

capacidad de adherencia de la bacteria a las células epiteliales y le permite resistir la actividad bactericida de las células polimorfonucleares (Hill *et al.*, 2016).

Proteína III (Rmp): a diferencia de las proteínas anteriores es estable en su composición. Resulta poco inmunogénica y bloquea a los anticuerpos dirigidos contra los otros antígenos de superficie. Su papel en la patogenia de la blenorragia aún se desconoce. La proteína PIII tiene funciones de porina (al igual que PI), por lo que permite el ingreso de nutrientes de bajo peso molecular por difusión (Hill *et al.*, 2016).

**III.5.3** Lipooligosacáridos (LOS): al igual que en otros microorganismos gramnegativos actúan como una endotoxina, pero carecen de las largas cadenas de polisacáridos presentes en las enterobacterias. Median la mayoría de los efectos tóxicos observables en los modelos experimentales. Esta estructura oligosacáridica presenta variaciones antigénicas entre las diferentes cepas y evade el sistema inmune del hospedero. Los anticuerpos anti-LOS tienen actividad bactericida, fijan el complemento y producen quimiotaxis (Hill *et al.*, 2016).

**III.5.4** Proteínas reguladoras del hierro: favorecen la supervivencia de *N.gonorrhoeae*, pues le permite incorporar el hierro transportado por la transferrina y la lactoferrina humanas y tal vez de la hemoglobina. El hospedero puede desarrollar anticuerpos específicos contra estas proteínas (Hill *et al.*, 2016).

**III.5.5** Proteínas H8: son dos lipoproteínas (LiP y Laz) de membrana externa que se detectan por la acción de anticuerpos monoclonales. Su función no está definida pero se cree que intervienen en la transportación de electrones en la respiración bacteriana e inducen la formación de anticuerpos no protectores (Hill *et al.*, 2016).

**III.5.6 IgA Proteasa:** esta proteína cliva la inmunoglobulina A1 humana en la región bisagra, un mecanismo importante para la inactivación de la IgA secretoria (Hill *et al.*, 2016).

*Neisseria gonorrhoeae* tiene varios plásmidos; un porcentaje elevado (95%) de las cepas poseen un plásmido pequeño, “críptico”, con peso molecular (PM) de  $2,4 \times 10^6$ , de función desconocida. Otros plásmidos con PM variables contienen genes que codifican para la producción de la enzima  $\beta$ -lactamasa, responsable de la resistencia de alto nivel a la penicilina. La transmisión de genes de resistencia a la penicilina y a la tetraciclina, de una célula gonocócica a otra se realiza mediante un proceso de conjugación, mediado por plásmidos que poseen PM de  $24,5 \times 10^6$  y  $25,2 \times 10^6$  MDa, respectivamente (Unemo *et al.*, 2016).

### **III.6 Patogenia**

*Neisseria gonorrhoeae* es siempre patógena en cualquier sitio anatómico donde se aísle. Las especies de neisserias no patógenas integran la microbiota normal del tracto respiratorio superior, colonizan la nasofaringe y en determinadas ocasiones se comportan como patógenos oportunistas (Hook *et al.*, 2008).

El gonococo expresa su primer nivel de patogenicidad al adherirse a la superficie epitelial de la uretra, el endocérvix, la vagina, las células epiteliales no ciliadas que recubren las trompas de Falopio e incluso los espermatozoides. Coloniza la superficie de la mucosa del tracto genital, crece *in vivo* bajo condiciones de disponibilidad limitada de hierro y evade la respuesta inmune del hospedero (Marrazzo *et al.*, 2015).

El primer paso en la infección gonocócica es la colonización del epitelio columnar. Los pili median la adhesión inicial a las células epiteliales. Las PME PII intervienen en la segunda etapa de la adherencia íntima y contribuyen a la invasión. Las PME PI impiden la unión del fagolisosoma en los leucocitos polimorfonucleares y reducen el metabolismo oxidativo y determinan la



capacidad de ciertas cepas para sobrevivir dentro de los fagocitos (Hill *et al.*, 2016).

Las células no ciliadas engloban a las bacterias por medio de pseudópodos. El LOS desencadena la respuesta inflamatoria, con liberación del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), que produce la escarificación del epitelio. Se sugiere que esta estructura es la responsable de la mayoría de los síntomas de la gonorrea y contribuye a la resistencia al suero y a la mayor capacidad de producir enfermedad sistémica (debido a una menor activación del complemento). *N. gonorrhoeae* se transporta en una vacuola de endocitosis, en la que puede replicarse y acentuar los procesos de citotoxicidad determinados por el LOS. Dentro de esta estructura, el gonococo se protege de la acción de macrófagos, anticuerpos y los antimicrobianos. La bacteria se dirige luego al sector basal de la célula, en donde ocurre la fusión de las vacuolas con la membrana basal, produciéndose la “descarga” del microorganismo en el tejido conectivo subepitelial, con inflamación local. Esto genera un exudado rico en polimorfonucleares que contiene numerosas bacterias intra y extracelulares, o bien ingresan a los vasos sanguíneos para producir la forma diseminada de la enfermedad (Hill *et al.*, 2016).

### **III.7 Diagnóstico de la enfermedad gonocócica**

#### **III.7.1 Diagnóstico clínico**

El espectro clínico de la gonorrea es amplio, con diferencias marcadas entre el hombre y la mujer en cuanto a la evolución, gravedad y sintomatología. En dependencia de las prácticas sexuales de los individuos, *N. gonorrhoeae* puede infectar la superficie de las mucosas del cuello del útero, uretra, recto, la oro y nasofaringe. La infección puede presentarse de forma asintomática o sintomática, con formas clínicas no complicadas o supuración aguda que pudiera culminar en una invasión tisular, con inflamación crónica y fibrosis (Marrazzo *et al.*, 2015).

En el hombre, la gonorrea se manifiesta como uretritis, con secreción purulenta, que puede ser autolimitada o extenderse a la uretra posterior, lo que suele producir epididimitis e incluso llevar al estado de portador crónico. En la mujer, la infección primaria tiene lugar en el endocérvix, presentándose como una cervicitis tan leve que pasa inadvertida, pocos días después de la exposición. En otras ocasiones la infección se extiende a la uretra, la vagina, llega a las trompas uterinas y produce salpingitis con fibrosis. Desde el punto de vista práctico la literatura considera la existencia de cinco formas clínicas de blenorragia femenina: portadora asintomática, gonorrea localizada, enfermedad inflamatoria pélvica, infección diseminada y gonorrea en el embarazo (Davey *et al.*, 2018; De Silva *et al.*, 2017).

En el ámbito mundial, la infección gonocócica es una causa común de infertilidad femenina, que ocurre en el 20% de las mujeres con salpingitis; no obstante, también los hombres tienen riesgo de presentar esta complicación, de no aplicarse el tratamiento adecuado. En los individuos expuestos por vía oral o anal, las infecciones gonocócicas pueden causar faringitis o proctitis asintomáticas, sobre todo, entre los hombres que tienen sexo con otros hombres (HSH) (Hui *et al.*, 2015).

El carácter asintomático o la presencia de escasos síntomas de la gonorrea en la mujer facilitan la diseminación y persistencia de la infección durante largos períodos y puede llegar a ser causa de infertilidad. Con menor frecuencia, la bacteria puede causar conjuntivitis, tenosinovitis, artritis, inflamación de la cápsula del hígado (síndrome de Fitz-Hugh-Curtis) y diseminación al torrente sanguíneo, con complicaciones severas (sepsis, meningitis y endocarditis). Las mujeres embarazadas tienen más riesgo de padecer infecciones gonocócicas diseminadas, por la mayor vascularización del tracto genital (Chan *et al.*, 2016; Foster *et al.*, 2016).

*Neisseria gonorrhoeae* causa infecciones en los recién nacidos, a quienes les produce una conjuntivitis grave, con complicaciones tales como perforación corneal, úlcera corneal y ceguera; es posible la presentación de una infección

diseminada con artritis, aunque resulta infrecuente en pacientes pediátricos (Goldenberg *et al.*, 2005).

### **III.7.2 Diagnóstico microbiológico**

#### **III.7.2.1 Recolección de la muestra**

Para realizar el diagnóstico microbiológico certero de la blenorragia se requiere tomar muestras representativas del proceso infeccioso. Los especímenes a obtener dependen de la sintomatología del paciente, la edad y el género. Los sitios primarios de preferencia son la uretra, en el hombre y el canal endocervical, en la mujer. Pueden tomarse asimismo otras muestras de secreciones y exudados de la uretra femenina, la vagina (recomendado en mujeres pre-adolescentes, histerectomizadas y menopáusicas), orofaringe, región anorrectal, los aspirados de las glándulas de Bartolino, el líquido sinovial y pericárdico y la sangre. Las muestras oftálmicas se obtienen de niños recién nacidos y adultos con síntomas de conjuntivitis purulenta de rápida instalación (Marrazzo *et al.*, 2015). En la actualidad en aras de incrementar la positividad diagnóstica de la gonorrea se sugiere tomar especímenes de diferentes sitios: uretra, faringe y región anorrectal, en especial, en HSH y en mujeres (Hui *et al.*, 2015).

Los hisopos recomendados para obtener las muestras son de dacrón o alginato de calcio sobre una varilla de plástico o aluminio. Los de algodón se utilizan para la inoculación directa en los medios de cultivo o de transporte, siempre que sean tratados antes con carbón activado, que absorbe las sustancias tóxicas (Llanes *et al.*, 2004).

#### **III.7.2.2 Transportación de las muestras clínicas**

Por no estar siempre garantizada la siembra directa de los productos patológicos en los medios de cultivo, se desarrollan medios de transporte para preservar la viabilidad del microorganismo hasta su traslado al laboratorio. Existen sistemas comerciales de transporte nutritivos tales como los medios de *Transgrow*, *Jembec*, *Isocult*, *Bio-Bag* y *Gono-Pack*, todos incorporan un medio para el

crecimiento de *N. gonorrhoeae* y tabletas que generan CO<sub>2</sub>. Los sistemas no nutritivos como los medios de Stuart y Amies se utilizan para la transportación de muestras durante un periodo entre 6 y 12 horas; el medio de transporte y conservación (TC) patentado en el IPK, garantiza la viabilidad del gonococo hasta seis semanas después de su inoculación (Llanes *et al.*, 2004).

### **III.7.2.3 Examen microscópico directo**

El examen microscópico directo mediante una muestra coloreada por el método de Gram es un procedimiento útil, sencillo y proporciona un diagnóstico presuntivo de la enfermedad. En el hombre, tiene 95 y 100% de sensibilidad y especificidad, respectivamente; sin embargo, en las mujeres la sensibilidad varía entre 40-60%. Los microorganismos se visualizan al microscopio de luz como diplococos gramnegativos intracelulares, dentro de las células polimorfonucleares neutrófilas (Elias *et al.*, 2011). En el caso de las muestras del cuello uterino y la orofaringe, la presencia de diplococos gramnegativos no se considera un dato confiable, ya que en esos sitios se encuentran otras especies de *neisserias* que forman parte de la microbiota normal (Llanes *et al.*, 2004).

### **III.7.2.4 Cultivo**

Debido a la naturaleza fastidiosa de *N. gonorrhoeae*, se emplean medios de cultivo que contienen suplementos nutricionales (hemoglobina, factores vitamínicos, aminoácidos esenciales y bases nitrogenadas). Las muestras clínicas genitales deben inocularse en medios selectivos como el agar *Thayer-Martin* modificado. También pueden utilizarse los medios de Martin-Lewis y New York City, que incluyen variantes en su formulación antimicrobiana. Los medios deben utilizarse frescos, debiéndose incubar entre 35-36,5°C durante 24 a 48 horas, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> entre 5 a 10% (Papp *et al.*, 2014).

### **III.7.2.5 Crecimiento y morfología**

El crecimiento de *N. gonorrhoeae* produce colonias de color blanquecino-grisáceas, de aspecto brillante, húmedas, con bordes precisos y tamaño que

oscila entre 0,5 y 5 mm, con opalescencia perlina a través de la luz transmitida. En cultivos puros la morfología de las células bacterianas es oval o esférica y a menudo se agregan en masas irregulares, sin la agrupación típica (diplococos) (Llanes *et al.*, 2004).

### III.7.2.6 Identificación

La identificación presuntiva de las colonias de *N. gonorrhoeae* se logra por medio de la coloración de Gram y las reacciones positivas a las pruebas de oxidasa y catalasa. Para la identificación definitiva en especie se utilizan pruebas enzimáticas, inmunológicas y de biología molecular. La producción de ácido a partir de la degradación de la glucosa al 1%, en medio de agar cistina – tripticasa semisólido (CTA) con rojo de fenol como indicador de pH, representa el método más empleado en países en desarrollo (Papp *et al.*, 2014).

Algunas pruebas enzimáticas permiten una rápida diferenciación entre las especies de *neisseria*, *N.gonorrhoeae* produce la enzima hidroxipropil-aminopeptidasa, *N.meningitidis* la gamma-glutamil aminopeptidasa y *N. lactamica* la beta-galactosidasa (Papp *et al.*, 2014).

Las pruebas inmunológicas ocupan un papel importante en la confirmación de *N.gonorrhoeae*. Constituyen tecnologías sensibles y específicas que utilizan anticuerpos monoclonales para revelar la presencia del microorganismo por los métodos de coaglutinación o inmunofluorescencia. Existen diferentes sistemas comerciales como *Phadebact Monoclonal GC test* (*Pharmacia Boule Diagnostica*) o *Gonogen II* (*Becton and Dickinson Inc*). Otras pruebas inmunológicas son la coloración directa con anticuerpos monoclonales fluorescentes y el sistema ELISA, que emplea anticuerpos policlonales absorbidos en la identificación de antígenos gonocócicos en muestras (Llanes *et al.*, 2004).

La utilización en años recientes de pruebas moleculares ha posibilitado realizar un diagnóstico rápido y certero de los microorganismos fastidiosos o que resulten imposibles de cultivar. Las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa

(RCP) a punto final y en tiempo real gonocócica ofrecen una alta sensibilidad y especificidad con relación a las pruebas convencionales y sus resultados no se interfieren con el uso previo de antibióticos por el paciente (Hui *et al.*, 2015).

### **III.8 Susceptibilidad antimicrobiana**

La resistencia de *N. gonorrhoeae* a los antimicrobianos es uno de los principales obstáculos a superar en el control de la blenorragia. Esta bacteria a lo largo de su historia muestra resistencia a diferentes familias de antimicrobianos: penicilinas, tetraciclinas, espectinomicina, fluoroquinolonas, azitromicina y más recientemente las cefalosporinas de espectro extendido, que es la última opción terapéutica para la infección (Unemo y Shafer, 2011).

La resistencia gonocócica a las penicilinas y tetraciclinas está producida por mecanismos cromosómicos o plásmídicos. La resistencia al resto de los antimicrobianos está mediada por mutaciones en el cromosoma; algunas de ellas contribuyen a la resistencia simultánea a varias clases de antimicrobianos (Pachulec y Van der Does, 2010).

La primera medicación curativa anti-gonocócica se logra en 1937, con la introducción de la sulfanilamida. En 1929, Alexander Fleming documenta la habilidad de la penicilina para inhibir la bacteria. Este hallazgo hizo que, desde 1943 y durante varias décadas fuera la base del tratamiento de la blenorragia. Sin embargo, pocos años después, *N. gonorrhoeae* desarrolla una resistencia de bajo nivel a la penicilina, lo que produjo fallos clínico-terapéuticos, que fueron resueltos incrementando las dosis del antibiótico (Unemo y Shafer, 2011).

A principios de la década del 70, en el Reino Unido y los Estados Unidos se notifican los primeros aislados de *N. gonorrhoeae* altamente resistentes a la penicilina, con CIM  $\geq$  8 mg/L, mediados por plásmidos de 3,2 MDa (tipo africano) y 4,4-4,7 MDa (tipo asiático), respectivamente, con capacidad de producir enzimas  $\beta$ -lactamasas de tipo TEM-1. Poco tiempo después se describen otros seis plásmidos que producen resistencia a este antibiótico: 2,9 MDa (variedad Río), 3,05 MDa (variedad Toronto), 4,0 MDa (tipo Nimes), 6,0 MDa (variedad

Nueva Zelanda) y los de 3,9 MDa y 2,2 MDa (Unemo y Shafer, 2014). Esta resistencia de alto nivel a la penicilina, tiene una expresión fenotípica variable, con valores de CIM que oscilan entre 2 y 64 mg/L (Zheng *et al.*, 2015).

La disminución gradual de la sensibilidad a los antimicrobianos es el resultado del efecto aditivo de múltiples mutaciones cromosómicas que provocan alteración en las proteínas de unión a la penicilina (PBPs), la hiperexpresión de las bombas de expulsión y la disminución de la entrada de los antibióticos a través de la membrana externa. Al menos cinco genes tienen implicación en esta resistencia: *ponA*, *penA*, *penB*, *pilQ* y *mtr*. Los genes *ponA* y *penA* codifican la síntesis de las PBP1 y PBP2, respectivamente, cuyas alteraciones afectan la actividad de las penicilinas. Las mutaciones en el gen *penB* induce alteraciones de una porina que causa resistencia a las tetraciclinas y una disminución de la sensibilidad a las quinolonas. La hiperexpresión de la bomba de expulsión MtrCDE favorece la resistencia a diversos antibióticos: penicilinas, macrólidos, rifampicina, tetraciclinas y quinolonas, y en la disminución de la sensibilidad a las cefalosporinas. Las mutaciones en el gen *pilQ* que codifica la síntesis de porina, provoca la resistencia de alto nivel a la penicilina en cepas con mutaciones en los genes *penA*, *penB* y *mtr*. Así, las CIM observadas son producto de la acción sinérgica de varias mutaciones, capaces de provocar una resistencia de alto nivel a este fármaco (Dillon *et al.*, 2013).

A partir de 1982 se notifica en el mundo una resistencia de alto nivel a la tetraciclina (CIM  $\geq$  8 mg/L) en *N. gonorrhoeae*, los primeros hallazgos se describen en Estados Unidos y Holanda. Esta elevada resistencia se relaciona con la presencia de un determinante *Tet-M* de tipo plasmídico, que confiere protección a la subunidad ribosomal 30s de la bacteria, diana de acción de la tetraciclina. Este determinante se porta en dos plásmidos conjugativos de 25,2 MDa, el tipo Holandés y el tipo Americano. Ambos son similares en talla molecular, pero pueden diferenciarse mediante el uso de enzimas de restricción y la secuenciación nucleotídica. Basado en esas diferencias se desarrollan diferentes secuencias de cebadores que permiten reconocer ambos tipos de plásmidos (Fayemiwo *et.al*, 2011, Zheng *et.al*, 2015). Hoy día, las cepas de *N. gonorrhoeae* que muestran alto nivel de resistencia frente a la tetraciclina y son

portadoras del determinante *tet-M* se notifican en todo el mundo (Pachulec y Van der Does, 2010).

Por su excelente tolerancia y seguridad, las fluoroquinolonas se convierten en los fármacos alternativos para el tratamiento de la gonorrea. A partir de 1993, el Centro para el Control de Enfermedades (CDC), de EEUU, recomienda el uso de la ciprofloxacina como primera línea para el manejo de la blenorragia, por su eficacia en cualquier sitio anatómico, pocos efectos adversos y requerir una sola dosis oral. No obstante, unos años más tarde, el 40% de las cepas de gonococo identificadas en Japón mostraban resistencia, efecto que se propaga con una gran velocidad desde Asia hasta Australia, Hawaii, California y el resto de los Estados Unidos. En la actualidad, la alta prevalencia de cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a las fluoroquinolonas constituye un problema para muchos países que aún emplean este antibiótico en el tratamiento de la blenorragia. En consecuencia, las fluoroquinolonas dejaron de recomendarse en muchos países (Lourenco *et al.*, 2017).

Los mecanismos de resistencia gonocócica a las quinolonas están mediados por mutaciones en los genes *gyrA*, *gyrB* y *parC*, que determinan cambios en la secuencia de aminoácidos en las subunidades *GyrA* y *GyrB* de la enzima topoisomerasa II (ADN-girasa) y en la subunidad *ParC* de la enzima topoisomerasa IV, que intervienen en el superenrollamiento del ADN. Las mutaciones en el gen *gyrB* confieren resistencia de bajo nivel al ácido nalidíxico; mientras que aquellas en los genes *gyrA* y *parC* confieren resistencia a las fluoroquinolonas. Las mutaciones en el gen *parC* solo se presentan en cepas que tienen como mínimo una mutación en el gen *gyrA* (Unemo *et al.*, 2014). Los genes responsables de la resistencia a las fluoroquinolonas se concentran en una región denominada QRDR (*quinolone-resistance determining-region*) y codifican la síntesis de los aminoácidos próximos al sitio activo de ambas enzimas (Dillon *et al.*, 2013).

Las cefalosporinas se descubren en 1945 por Guiseppe Brotzu, en particular la ceftriaxona (uso parenteral) y la cefixima (uso oral) tienen una elevada actividad in vitro anti-*N. gonorrhoeae*, por lo que son recomendadas por la OMS y el CDC



como únicos tratamientos de primera línea de la gonorrea. La ceftriaxona posee mayor actividad antimicrobiana y es además efectiva en el manejo de la infección gonocócica faríngea, de ahí que constituya la principal droga recomendada (Unemo y Dillon, 2011, Unemo y Shafer, 2014). Para los pacientes alérgicos a las cefalosporinas, el CDC sugiere emplear la espectinomicina (CDC, 2015).

A pesar de su fiabilidad para tratar las infecciones gonocócicas, la resistencia a las cefalosporinas se desarrolla y extiende en Asia, con la subsiguiente introducción en Australia y Europa (ECDC, 2016; Weston *et al.*, 2017). La disminución de la sensibilidad a las cefalosporinas es de naturaleza cromosómica, resulta de la combinación de los efectos de varias mutaciones en diferentes genes. El gen *penA* codifica para la síntesis de la proteína de unión a la penicilina (PBP2), el gen *penB* afecta la entrada del antimicrobiano a través del canal de la PME PorB 1b, el tercer gen, *rmtrR*, es un represor del sistema transportador MtrCDE (Zhao *et al.*, 2009; Bolan *et al.*, 2012; Guerra *et al.*, 2013).

La cefixima reduce su efectividad frente a *N. gonorrhoeae*. A partir de 2006, se produce un aumento de las CIM a este antibiótico en Estados Unidos y otros países (CDC, 2012). En Europa se reporta la existencia de fallos terapéuticos en pacientes con gonorrea tratados con esta cefalosporina oral (Unemo *et al.*, 2016).

La espectinomicina, se introduce como alternativa en el tratamiento de la gonorrea resistente a los antimicrobianos y para el manejo de los pacientes alérgicos a otros fármacos, sin embargo, su elevada nefrotoxicidad y ototoxicidad conspiran contra su uso. En la actualidad, la mayoría de los aislamientos gonocócicos se mantienen sensibles a este fármaco y aunque desde 1973 se describen bacterias resistentes, la prevalencia es baja (Unemo *et al.*, 2016).

La emergencia de cepas de *N. gonorrhoeae* con disminución de la sensibilidad a las cefalosporinas de tercera generación, asociado con fracasos terapéuticos conduce a la consideración de alternativas en el tratamiento de la blenorragia. En ese sentido se recomiendan los aminoglucósidos (gentamicina y kanamicina), pero existe escasa evidencia clínica de su uso para tratar las infecciones

gonocócicas, también la correlación clínica y de laboratorio ha sido poco estudiada (Dowell *et al.*, 2012; Hathorn *et al.*, 2014). Estos antibacterianos en cambio han sido utilizados en Indonesia y Malawi para tratar la gonorrea, con éxito (Chisholm *et al.*, 2011).

### **III.9 Caracterización de cepas resistentes**

Existen varios métodos para realizar la caracterización fenotípica y genotípica de *N.gonorrhoeae*, que facilitan una interpretación más fina de los datos en cuanto a la resistencia antimicrobiana (Unemo *et al.*, 2016).

Los métodos de tipificación fenotípica incluyen los estudios de susceptibilidad antimicrobiana, la determinación de los auxotipos (basados en los requerimientos nutricionales para el crecimiento de este microorganismo) y la serotipificación, ambos pueden utilizarse como marcadores epidemiológicos primarios. Se incluyen, además, como métodos fenotípicos la tipificación por la presencia de la enzima  $\beta$ -lactamasa plasmídica (Tapsall, 2011).

El método de dilución en agar es la técnica de referencia recomendada para la determinación de la CIM en *N. gonorrhoeae*. También se recomienda el uso del método de *E- test* frente a diferentes antimicrobianos, en especial si el número de aislados es pequeño (Starnino y Dillon, 2010). Al mismo tiempo, se sugiere emplear el método de difusión con discos de antibióticos para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana en *N. gonorrhoeae*. En esta prueba, el agente difunde en el medio de cultivo y origina una zona de inhibición del crecimiento alrededor del disco, correspondiente a la susceptibilidad de la cepa frente al antimicrobiano. El método de *E- test* utiliza un procedimiento similar al de la difusión con disco, la diferencia consiste en el uso de tiras que contienen diferentes gradientes calibrados del antimicrobiano, que permiten establecer la CIM del agente. Ambos métodos tienen como limitación la variación de los resultados en dependencia de diferentes factores: base del medio de cultivo, la humedad y el tiempo de preparación del medio (CLSI, 2017).

En la actualidad los métodos genotípicos son los más empleados en la tipificación de *N. gonorrhoeae*, por su alto poder discriminatorio y reproducibilidad. Entre ellos se destaca la amplificación de genes de la proteína Opa, la tipificación mediante polimorfismo de cadenas con enzimas de restricción (RFLP) y la electroforesis en campo pulsado (PFGE). Esta última permite la separación de largos fragmentos de ADN y la identificación de cepas circulantes en una región particular y todos los métodos en general aportan datos valiosos a la microepidemiología (Unemo y Dillon, 2011; Tapsall, 2011).

Existen otras pruebas genotípicas basadas en la secuenciación del ADN de gonococo, que incluye el análisis de la proteína PorB, mediante los métodos de *multiantigen sequence typing* (NG-MAST) y el *multilocus sequence typing* (MLST). Ambos tienen un alto poder discriminatorio, siendo en la actualidad los más recomendados en la realización de estudios de epidemiología molecular (Lebedzeu *et al.*, 2015, Harrison *et al.*, 2016; Jabeen *et al.*, 2016; Abrams y Trees, 2017).

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **IV.1 Diseño general**

Se realizó un estudio descriptivo en el LNR de *Neisserias* y *Helicobacter* (LNR-NH) del IPK, que incluyó la selección al azar de 34 cepas de *N.gonorrhoeae* pertenecientes a la colección de dicho laboratorio y que fueron obtenidas entre los años 2009 y 2016. Se excluyeron las cepas que no eran viables en el subcultivo y las que estaban contaminadas.

### **IV.2 Identificación y conservación de las cepas**

Para su identificación, las cepas fueron subcultivadas en el medio de agar Thayer Martin modificado, (BIOCEN), más sangre de carnero (10%), 1% de suplemento enriquecedor Vitox (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) e inhibidor VCNT (vancomicina, colistina, nistatina y trimetoprim (Oxoid). Las placas se incubaron de 35-37°C, en 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24-48 horas (Papp *et al.*, 2014). Posteriormente se realizaron las pruebas de identificación de género y especie, mediante las pruebas de coloración de Gram, de la oxidasa (método de Kovacs), de superoxol o catalasa (peróxido de hidrógeno 30%) y la prueba de utilización de glucosa al 1% en el medio CTA (Oxoid) (Starnino y Dillon, 2010).

Control positivo de estas pruebas: *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226.

Control negativo de estas pruebas: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

### **IV.3 Susceptibilidad antimicrobiana. Método de E-test**

La susceptibilidad antimicrobiana de *N.gonorrhoeae* frente a la tetraciclina se determinó por el método de difusión en agar con tiras de E-test (bioMérieux, Francia) y se obtuvo la CIM de las cepas a estudiar.

Para la preparación del inóculo se tomaron varias colonias del microorganismo procedentes de los subcultivos incubados durante 18-24 horas en un medio de agar chocolate enriquecido con 1% de Vitox; las colonias se transfirieron y

suspendieron en un tubo con 5 mL de caldo Mueller-Hinton (Oxoid), estéril. Luego, la suspensión se ajustó e igualó de forma visual, con el patrón de turbidez 0,5 de la escala de McFarland, equivalente a  $10^8$  unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL). La siembra se realizó en las placas con medio de agar GC suplementado con Vitox (1%) (anexo 1), sobre el cual se colocaron las tiras de *E-test* con los diferentes gradientes de concentración del antimicrobiano (0,016-256 µg/mL) (bioMérieux). Las placas se incubaron durante 20-24 horas en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> a 35-37°C (Starnino y Dillon, 2010).

La interpretación de los resultados se realizó en base a las categorías de sensible, susceptibilidad intermedia o resistente, según los puntos de corte de CIM establecidos (CLSI, 2017).

Tabla 1. Criterios interpretativos de la susceptibilidad antimicrobiana en las cepas de *N.gonorrhoeae* frente a la tetraciclina

| Antimicrobiano | Sensible     | Susceptibilidad Intermedia | Resistente  |
|----------------|--------------|----------------------------|-------------|
| Tetraciclina*  | ≤ 0,25 µg/mL | 0,5 - 1,0 µg/mL            | ≥ 2,0 µg/mL |

\*CLSI, 2017

Se utilizaron como cepas controles las siguientes: WHO F (Sensible), WHO P (Susceptibilidad intermedia), WHO G (Resistente), ATCC 49226 (Susceptibilidad intermedia) (Unemo *et al.*, 2016)

#### IV.4 Detección de resistencia plasmídica a la tetraciclina

##### IV.4.1 Preparación del ADN

La extracción de ADN plasmídico se realizó mediante el estuche comercial QIAamp DNA Mini kit, (Qiagen), según las instrucciones del fabricante (Qiagen, 2011). Luego, se midió la concentración mediante absorbancia, utilizando un espectrofotómetro (Spectro UV-VIS 200-1000nm, Mrc, Germany). El ADN extraído se conservó a – 20 °C hasta su uso.

#### IV.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa para el determinante *Tet-M*

Se realizó la técnica de PCR simple a todas las cepas incluidas en la investigación con el propósito de evidenciar la presencia del determinante *Tet-M* en aquellas que exhibían una CIM  $\geq 8\mu\text{g/mL}$  a la tetraciclina. Se utilizaron los cebadores Tet1 5'ATCCTTTCTGGGCTTCCATTG3' y Tet2 5'CCGAGCAGGGATTCTCCAC3' para identificar el determinante *Tet-M* de tipo Holandés o Americano (Turner *et. al*, 1999).

Se preparó la mezcla principal en un tubo microcentrífuga de 1,5 mL, en la estación de trabajo libre de ADN. Se utilizaron reactivos de Qiagen para todas las amplificaciones.

| Reactivo                                              | Cantidad           |
|-------------------------------------------------------|--------------------|
| Agua bidestilada estéril                              | 58,7 $\mu\text{L}$ |
| Tampón específico de enzima <i>Taq</i>                | 10 $\mu\text{L}$   |
| dNTPs (200mM) de cada uno en (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | 0,8 $\mu\text{L}$  |
| Cebador 1 (0,1 $\mu\text{g/mL}$ )                     | 2,0 $\mu\text{L}$  |
| Cebador 2 (0,1 $\mu\text{g/mL}$ )                     | 2,0 $\mu\text{L}$  |
| <i>Taq</i> ADN polimerasa (5U/ $\mu\text{L}$ )        | 0,5 $\mu\text{L}$  |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)                             | 6,0 $\mu\text{L}$  |

La mezcla principal se distribuyó en tubos Micro Amp estériles (Perkin-Elmer) en alícuotas de 20  $\mu\text{L}$ .

En el área destinada para la adición del ADN, se procedió a la adición de 5  $\mu\text{L}$  de la muestra celular con buffer lisis al tubo con la mezcla de reacción. Se colocaron los tubos en el termociclador (Techne). Se utilizó el siguiente

programa: 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 44°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 3 minutos y un ciclo final con una extensión prolongada de 5 minutos a 72°C (Sosa, 2002).

Los productos de ADN amplificados se analizaron mediante electroforesis submarina. Se adicionaron 10 µL de cada muestra a un gel de agarosa al 1%, empleando un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb) en cada gel. La coloración del mismo se llevó a cabo con solución de bromuro de etidio (5%) y para la visualización se utilizó un transiluminador UV (Macrovue 2011, LKB).

La talla esperada de los productos amplificados por la PCR fue de 778 pb para el determinante *Tet-M* de tipo Americano y 443 pb para el determinante *Tet-M* de tipo Holandés (Turner *et. al*, 1999; Pachulec y Van der Does, 2010). Como controles se utilizaron tres cepas de referencia de *N.gonorrhoeae* de la OMS: WHO G, portadora del determinante *tet-M* de tipo Holandés, WHO N, portadora del determinante *Tet-M* de tipo Americano y WHO K, carente de plásmidos de resistencia, como control negativo (Unemo *et al.*, 2016).

#### **IV.5 Análisis estadístico**

Para el procesamiento estadístico de la información se utilizó una PC IR-2, los textos se procesaron en Word 2010 y los resultados se representaron en tablas y figuras elaboradas en Excel 2010, a partir de la recogida y el almacenamiento de los datos.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.1 Susceptibilidad antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* frente a la tetraciclina

La notificación de una alta proporción de cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes y multirresistentes a los antimicrobianos empleados en el tratamiento de la blenorragia se reporta de forma continua en la literatura internacional. Esto pudiera explicar la elevada morbilidad y las complicaciones que se presentan en el curso de esta enfermedad (Unemo *et al.*, 2016).

Durante muchos años, la tetraciclina constituyó una opción terapéutica útil para la blenorragia; sin embargo, en la actualidad su escasa efectividad se relaciona con la resistencia desarrollada por *N. gonorrhoeae* (Patel *et al.*, 2011, Unemo y Shafer, 2014).

Al analizar la susceptibilidad antimicrobiana a la tetraciclina en las 34 cepas investigadas, la mayoría (79,4%; 27/34) mostró resistencia, en tanto 20 de estas cepas resistentes eran TRNG, ya que expresaron una resistencia de alto nivel (CIM $\geq$ 8  $\mu$ g/mL) a este antibiótico, mientras que en las restantes 7 se constató una resistencia de bajo nivel (CIM 2-4  $\mu$ g/mL); 4 cepas exhibieron susceptibilidad intermedia (CIM 0,5 - 1,0  $\mu$ g/mL) y otras 3 se mostraron sensibles frente a la tetraciclina (CIM  $\leq$ 0,5  $\mu$ g/mL) (tabla 2).

Tabla 2. Susceptibilidad antimicrobiana a la tetraciclina de 34 cepas cubanas de *N.gonorrhoeae*, 2009-2016

| Antimicrobiano | Sensible | Intermedia | Resistente |
|----------------|----------|------------|------------|
|                | no/%     | no/%       | no/%       |
| Tetraciclina   | 3 (8,8%) | 4 (11,8%)  | 27 (79,4%) |

El porcentaje de resistencia a la tetraciclina en cepas de *N. gonorrhoeae* encontrado (79,4%) coincide con el reporte que realiza Sosa y colaboradores, en Cuba (Sosa *et al.*, 2003). Sin embargo, otras investigaciones previas



desarrolladas en el país revelan cifras inferiores de resistencia a este antibiótico (Llanes *et al.*, 2003 Dillon *et al.*, 2013). Esto pudiera estar relacionado con el amplio uso de la tetraciclina para el tratamiento de diversas infecciones en humanos, a pesar de que desde la primera década del siglo actual dejó de emplearse como tratamiento de primera línea de las infecciones gonocócicas en nuestro país (Plan Estratégico ITS-VIH-sida, 2013). Habría que señalar también, que la propia selección al azar de las cepas en el presente estudio, pudo haber seleccionado aquellas que mostraron resistencia a la tetraciclina.

En América Latina y el Caribe, un estudio multicéntrico informa de un descenso considerable en los valores de resistencia a la tetraciclina desde 60 a 35%, durante un período de nueve años; aunque en países como Venezuela la resistencia oscila entre 48 y 63%, a diferencia de Brasil donde notifican cifras inferiores (2-40%) (Dillon *et al.*, 2013). De igual forma, Thakur y colaboradores en el 2017, realizan una investigación en América del Sur y Cuba, con un 21,8 y 22,6% de resistencia a la tetraciclina entre 2010 y 2011 (Thakur *et al.*, 2017). En Europa también existe una baja resistencia (36%) a este antibiótico (Lebedzeu *et al.*, 2015).

La resistencia plasmídica de *N.gonorrhoeae* a la tetraciclina se reconoce por primera vez en Estados Unidos y Holanda hacia 1982 y 1985, respectivamente (Unemo y Shafer, 2014). A partir del hallazgo de la primera cepa con elevada resistencia a este antibiótico (TRNG), se produce la aparición y posterior diseminación en el resto del mundo; tal es el caso de Estados Unidos, Singapur, Islas Salomón y Vietnam (Tapsall, 2011). Situación similar ha ocurrido en África, Europa y América Latina (Alam *et al.*, 2012). En China, se reporta un incremento del porcentaje de alta resistencia a tetraciclina del 29,4% al 52,1%, entre 2002 y 2012 (Zheng *et.al.*, 2015), lo que coincide con lo reportado por Tapsall y Fa-xing en países del Pacífico y Asia, respectivamente (Tapsall, 2011; Fa-Xing *et al.*, 2017).

## **V.2 Determinante *Tet-M* en cepas de *N. gonorrhoeae***

En el presente estudio, se identificó la presencia de plásmidos que portan el determinante *Tet-M* de tipo Holandés en 18 cepas de *N. gonorrhoeae*, lo que representó el 52,9% del total de las cepas investigadas, con un franco predominio en aquellas que mostraron una resistencia de alto nivel frente a la tetraciclina (CIM  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$  [16/20 cepas]). En las restantes 4 cepas altamente resistentes a este antimicrobiano no se demostró la presencia del determinante *Tet-M* (Figura 1). No se detectó la presencia del determinante plasmídico *Tet-M* de tipo Americano en ninguna de las cepas investigadas.



**Figura 1. Electroforesis submarina de los productos amplificados mediante PCR.** Línea 1: control positivo de determinante *Tet-M* tipo Americano. Línea 2: control positivo de determinante *Tet-M* tipo Holandés. Líneas 3,4,7,8: cepas de estudio con determinante *Tet-M* tipo Holandés. Líneas 5 y 6: cepas de estudio no portadoras del determinante *Tet-M*. Línea 9: control negativo. Línea 10: patrón de peso molecular de 100pb (Promega)

Un estudio multicéntrico realizado por Ezewudo y colaboradores en Sudáfrica revela que el determinante *Tet-M* se observó solo en 5 de 10 cepas de *N.gonorrhoeae* con resistencia de alto nivel a la tetraciclina; la ausencia en las restantes cinco cepas se atribuye a la acción de mecanismos cromosómicos de resistencia, debido a mutaciones únicas o combinadas en uno o más de los genes *mtrR*, *penB*, o *rpsJ*, las cuales pueden elevar de forma considerable los valores de la CIM (Ezewudo *et al.*, 2015).

Resulta interesante en la presente investigación, el hallazgo del determinante plasmídico *Tet-M* en dos cepas de gonococo con resistencia de bajo nivel a

tetraciclina (CIM = 2 µg/mL). Pocos estudios en el mundo investigan la presencia de plásmidos de resistencia a la tetraciclina en cepas de *N. gonorrhoeae* con resistencia de bajo nivel a este antibiótico. Tal es el caso de Greco y colaboradores en Canadá, que identifican el determinante *Tet-M* Americano en cuatro cepas con CIM=2 µg/mL (Greco *et al*, 2003). Pachulec y colaboradores en Holanda investigan 60 cepas con diferentes patrones de susceptibilidad y describen la existencia del determinante *Tet-M* Holandés en dos cepas de gonococo con una CIM de 1 y 6 µg/mL (Pachulec *et al*, 2010).

En el presente estudio no se identificó determinante plasmídico *Tet-M* en las cepas sensibles o con sensibilidad intermedia a la tetraciclina, como era de esperar (Tabla 3).

Tabla 3. Determinante plasmídico *Tet-M* en 34 cepas cubanas de *N.gonorrhoeae* según categoría interpretativa y valor de concentración inhibitoria mínima a la tetraciclina, 2009-2016.

| <b>Categoría interpretativa</b> | <b>CIM tetraciclina µg/mL</b> | <b>Tipo de determinante plasmídico <i>Tet-M</i></b> |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------|
| <b>R*</b>                       | <b>&gt;256</b>                | <b>Holandés</b>                                     |
| <b>R*</b>                       | <b>256</b>                    | <b>No detectado</b>                                 |
| <b>R*</b>                       | <b>64</b>                     | <b>Holandés</b>                                     |
| <b>R*</b>                       | <b>64</b>                     | <b>Holandés</b>                                     |
| <b>R*</b>                       | <b>64</b>                     | <b>Holandés</b>                                     |
| <b>R*</b>                       | <b>64</b>                     | <b>Holandés</b>                                     |
| <b>R*</b>                       | <b>64</b>                     | <b>Holandés</b>                                     |
| <b>R*</b>                       | <b>32</b>                     | <b>Holandés</b>                                     |
| <b>R*</b>                       | <b>32</b>                     | <b>Holandés</b>                                     |
| <b>R*</b>                       | <b>32</b>                     | <b>Holandés</b>                                     |

|           |             |                     |
|-----------|-------------|---------------------|
| <b>R*</b> | <b>32</b>   | <b>Holandés</b>     |
| <b>R*</b> | <b>32</b>   | <b>No detectado</b> |
| <b>R*</b> | <b>32</b>   | <b>Holandés</b>     |
| <b>R*</b> | <b>16</b>   | <b>No detectado</b> |
| <b>R*</b> | <b>16</b>   | <b>Holandés</b>     |
| <b>R*</b> | <b>16</b>   | <b>Holandés</b>     |
| <b>R*</b> | <b>8</b>    | <b>Holandés</b>     |
| <b>R*</b> | <b>8</b>    | <b>Holandés</b>     |
| <b>R*</b> | <b>8</b>    | <b>Holandés</b>     |
| <b>R*</b> | <b>8</b>    | <b>No detectado</b> |
| <b>R</b>  | <b>4</b>    | <b>No detectado</b> |
| <b>R</b>  | <b>2</b>    | <b>No detectado</b> |
| <b>R</b>  | <b>2</b>    | <b>Holandés</b>     |
| <b>R</b>  | <b>2</b>    | <b>No detectado</b> |
| <b>R</b>  | <b>2</b>    | <b>No detectado</b> |
| <b>R</b>  | <b>2</b>    | <b>Holandés</b>     |
| <b>R</b>  | <b>2</b>    | <b>No detectado</b> |
| <b>I</b>  | <b>1</b>    | <b>No detectado</b> |
| <b>I</b>  | <b>1</b>    | <b>No detectado</b> |
| <b>I</b>  | <b>1</b>    | <b>No detectado</b> |
| <b>I</b>  | <b>1</b>    | <b>No detectado</b> |
| <b>S</b>  | <b>0,12</b> | <b>No detectado</b> |
| <b>S</b>  | <b>0,02</b> | <b>No detectado</b> |
| <b>S</b>  | <b>0,12</b> | <b>No detectado</b> |

\*Alto nivel de resistencia (CIM  $\geq$  8  $\mu$ g/mL)

La distribución del determinante plasmídico *Tet-M* de tipo Holandés o Americano en *N. gonorrhoeae* varía según las regiones geográficas del mundo y el período de estudio de las cepas. Las primeras investigaciones llevadas a cabo en Europa entre 1988 y 1995, describen una distribución variada del determinante *Tet-M*, con predominio del tipo Americano sobre el Holandés (82% vs 18%, respectivamente). Igual comportamiento se reporta en África (98,3% vs 0,7%) y el Caribe (64,3% vs 35,7%). En cambio, en Asia, solo se detecta el determinante *Tet-M* Holandés (100%) (Turner *et al.*, 1999).

Estudios recientes realizados en países como Italia, revelan un mayor reconocimiento (77,8%) del determinante *Tet-M* de tipo Americano en las cepas TRNG, aisladas entre 2003 y 2005 (Starnino *et al.*, 2008). De forma similar, Fayemiwo y colaboradores comunican un predominio de este determinante plasmídico en Sudáfrica, en 2008 (Fayemiwo *et al.*, 2011).

Por el contrario, en Asia, predomina el determinante *Tet-M* de tipo Holandés en las cepas de gonococo altamente resistentes a la tetraciclina, en distintos períodos de la vigilancia de laboratorio: 100%, entre 1988-1995 en diferentes países (Turner *et al.*, 2009), 99,2% y 96,2%, entre 1999 y 2012 en China (Li *et al.*, 2014), Bangladesh 98,7%, en 2011 (Alam *et al.*, 2012). Reportes más recientes en China también señalan la mayor proporción de este determinante (Zheng *et al.*, 2015; Fa-Xing *et al.*, 2017).

Recientemente, Młynarczyk y colaboradores en Polonia, describen una mayor frecuencia del determinante *Tet-M* Holandés entre las cepas TRNG, en contraposición a lo que se reporta en la mayoría de los países europeos (Młynarczyk *et al.*, 2016).

En la actualidad, varios países de América Latina y el Caribe notifican asimismo una elevada prevalencia del determinante *Tet-M* de tipo Holandés en cepas de *N. gonorrhoeae*, como es el caso de Brasil (76,5%), Guyana (61,1%), Trinidad y Tobago (95,5%) y San Vicente y las Granadinas (93,3%). En América del Norte,

también se reporta un discreto predominio del determinante *Tet-M* de tipo Holandés (60%) con relación al tipo Americano (40%) (Dillon *et.al*, 2013).

Los resultados del presente estudio donde solo se identificó el determinante *Tet-M* de tipo Holandés de 443 pb, coinciden con el reporte multinacional realizado por Dillon y colaboradores en la región de las Américas (Dillon *et al*, 2013). Sin embargo, muestran diferencias sustanciales con el reporte llevado a cabo por Sosa y colaboradores, en Cuba, quien documenta un predominio del determinante plasmídico de tipo Americano en el 82,7% de las cincuenta y nueve cepas TRNG estudiadas en el período 1995-1998 (Sosa, 2002). Estas nuevas características epidemiológicas de las cepas de *N.gonorrhoeae* en nuestro país, pudiera corresponder con la introducción y posterior diseminación del determinante plasmídico *Tet-M* de tipo Holandés a partir de los aislados que circulan en nuestra región geográfica.

.

.

## VI. CONCLUSIONES

1. El predominio de cepas cubanas de *N. gonorrhoeae* con alto nivel de resistencia a la tetraciclina portadoras del determinante plasmídico *Tet-M* de tipo Holandés, sugiere su introducción y posterior diseminación en el país a partir de los aislados que circulan en nuestra región geográfica.
2. La presencia del determinante plasmidico *Tet -M* en *N. gonorrhoeae* con alto y bajo nivel de resistencia a la tetraciclina, sugiere su estudio en todas las cepas resistentes a este antimicrobiano.

## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Incorporar estudios genéticos de resistencia cromosómica a las cepas cubanas de *N.gonorrhoeae*.
2. Realizar estudios de detección del determinante plasmídico *Tet-M* a la totalidad de las cepas de *N.gonorrhoeae* resistentes a la tetraciclina.



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adeolu M, Gupta R. Genomic sequencing of *Neisseria gonorrhoeae* to respond to the urgen for división of the order Neisseriales into the emended family *Neisseriaceae* and *Chromobacteriaceae* fam. nov. Antoine Van Leeuwenhoek. 2013; 104(1):1-24.

Alam M, Chowdhury Z, Chowdhury A, Rahman M. Epidemic plasmids in *Neisseria gonorrhoeae* isolated from high-risk population in Bangladesh. Mymensingh Med J. 2012; 21:220–5.

Anuario Estadístico de Salud 2016. Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud. MINSAP. 2017. [en internet]. Disponible en: <http://bvscuba.sld.cu/anuario-estadistico-de-cuba>. Acceso 03.08.17

BIOCEN. Catálogo de medios de cultivo elaborados, Cuba. 2002.

Bodoev I, Ilina E. Molecular mechanisms of drug resistance *Neisseria gonorrhoeae* history and prospects. Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. 2015; 33: 22–27.

Bolan GA., Frederick SP, Wasserheit JN. The Emerging Threat of Untreatable Gonococcal Infection. N Engl J Med. 2012; 366:485-487.

Campos J. Uso de los antibióticos en la comunidad: la prevalencia como punto de partida. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012; 30(10): 589-590.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update to CDC's Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines: Oral Cephalosporins No Longer a Recommended Treatment for Gonococcal Infections. 2012; 61(31):590-594.

Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. MMWR. 2015; 64: 1–140.

Chan P, Robinette A., Montgomery M. Extragenital infections caused by *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: a review of the literature. Infect Dis Obstet Gynecol. 2016; 57:583-87.

Chisholm S, Quaye N, Cole M, Fredlund H, Hoffmann S, Jensen JS, et al. An evaluation of gentamicin susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Europe. J Antimicrob Chemother. 2011; 66(3):592-595.

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI): *Neisseria gonorrhoeae*. In Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017; 37(1):72-76.

Davey D, Peters R, Kojima N, Mudau M, De Vos L, Olivier D, et al. Sexual behaviors of HIV-infected pregnant women and factors associated with sexual transmitted infection in South Africa. Sex Trnsm Dis. 2018 [en internet]. Disponible en: <http://insights.ovid.com/DOI:10.1097/OLQ>. Acceso 13.04.2018.

De Silva D, Peters J, Cole K, Cole M, Cresswell F, Dean G, et al. Whole-genome sequencing to determine *Neisseria gonorrhoeae* transmission: an observational study. Lancet Infect Dis. 2016; 16(11): 1295–1303.

Dillon J, Parti R. Fluoroquinolone Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: ¿Fitness Cost or Benefit? JID. 2012: 205.

Dillon J, Trecker M, Thakur S, Llanes R, Llop A, Galarza P. Gonococcal Antimicrobial Surveillance Program Network in Latin America and Caribbean 1990–2011. Two decades of the gonococcal antimicrobial surveillance program in South America and the Caribbean: challenges and opportunities. Sex Transm Infect. 2013; 89(4):36–41.

Dowell D, Kirkcaldy R. Effectiveness of Gentamicin for Gonorrhoea Treatment. Sex Transm Infect. 2012; 88(8):589-594.

ECDC. Gonococcal Antimicrobial Susceptibility Surveillance in Europe 2014. Stockholm: ECDC; 2016. [en internet]. Disponible en: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/gonococcal-antimicrobial-susceptibility-surveillance-Europe-2014.pdf>. Acceso 02.06.17

Elias J, Frosch M, Vogel U. *Neisseria*. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH Landry ML, Warnock DW, eds. Manual of clinical microbiology. 10th ed. Washington, DC: American Society of Microbiology; 2011:559–603.

Ezewudo M, Joseph S, Castillo-Ramirez S, Dean D, del Rio C, Didelot X, Dillon J, et al. Population structure of *Neisseria gonorrhoeae* based on whole genome data and its relationship with antibiotic resistance. PeerJ. 2015; 3(806):1-23.

Fa-Xing J, Quian L, Weng-Jing L, Xiao-Hong S. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Hefei (2014-2015): genetic characteristics of antimicrobial resistance. BMC Infect Dis. 2017; 17: 366.

Fayemiwo SA, Müller EE, Gumede L, Lewis DA. Plasmid-mediated penicillin and tetracycline resistance among *Neisseria gonorrhoeae* isolates in South Africa: prevalence, detection and typing using a novel molecular assay. Sex Transm Dis. 2011; 38: 329–33.

Foster K, Cole M, Hotonu O, et al. How to do it: lessons identified from investigating and trying to control an outbreak of gonorrhoea in young heterosexual adults. Sex Transm Infect. 2016 sextrans–2015–052303.

Fuertes de Vega I, Baliu C, Bosh J, Vergaa A, Vallés X, Alsina M. Risk factors for antimicrobial-resistant *Neisseria gonorrhoeae* and characteristics of patients infected with gonorrhea. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2018;36(3): 165-168.

Greco v, Lai-king N, Catana R, Li H, Dillon J. Molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with plasmid-mediated tetracycline resistance in Canada: temporal and geographical trends (1986–1997). Microbial drug resistance. 2003; 9(4):353-359.

Guerra L, Vázquez F. *Neisseria gonorrhoeae* multirresistente: ¿regreso al pasado? Enferm Infec Microb Clin. 2013; 31(9):565-567.

Harrison O, Clemence M, Dillard J, Tang C, Trees D, Grad Y. Genomic analyses of *Neisseria gonorrhoeae* reveal an association of the gonococcal genetic island with antimicrobial resistance. J Infect. 2016; 73(6): 578–587.

Hathorn E, Dhasmana D, Duley L, Ross JD. The effectiveness of gentamicin in the treatment of *Neisseria gonorrhoeae*: a systematic review. System Rev. 2014; 3:104.

Hill S, Masters T, Wachter J. Gonorrhea - an evolving disease of the new millennium. Microb Cell. 2016 Sep 5; 3(9): 371–389.

Hook EW III, Handsfielsd HH. Gonococcal infections in the adult. In: Holmes KK, Sparling FF, Stamm WE, et al., eds. Sexually transmitted diseases. 4th ed. New York, NY: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2008:627–45.

Hui B, Fairley CK, Chen M, et al. Oral and anal sex are key to sustaining gonorrhoea at endemic levels in MSM populations: a mathematical model. Sex Transm Infect. 2015; 91:365–9.

Ilina E, Vereshchagin V, Borovskaya A, Malakhova M, Sidorenko S, Al-Khafaji, et. al. Relation between genetic markers of drug resistance and susceptible profile of clinical *Neisseria gonorrhoeae* strains. Antimicrob. Agents Chemother. 2008; 10: 1128. [en internet]. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1148-9>. Acceso 16.08.2017.

Jabeen K, Bhawan M, Khan E, Chandio S, Jacobsson S, Unemo M. Antimicrobial resistance and *Neisseria gonorrhoeae* multiantigen sequence typing (NG-MAST) genotypes in *N. gonorrhoeae* during 2012-2014 in Karachi, Pakistan. BMC Infect Dis. 2016; 16:353.

Kirkcaldy R, Harvey A, Papp JR, Del Rio C, Soge O, Holmes K. *Neisseria gonorrhoeae* Antimicrobial Susceptibility Surveillance - The Gonococcal Isolate Surveillance Project, 27 Sites, United States, 2014. MMWR Surveill Summ. 2016;65(7):1-19.

Kubanov A, Leinsoo A, Chestkov A, Dementieva E, Shaskolskiy B, Solomka V. Drug Resistance Mutations and Susceptibility Phenotypes of *Neisseria gonorrhoeae* Isolates in Russia. Molecular Biology. 2017; 51(3): 379–388.

Lebedzeu F, Golparian D, Titov L, Unemu M. Antimicrobial susceptibility/resistance and MAST characterisation of *Neisseria gonorrhoeae* in Belarus, Eastern Europe, 2010-2013. BMC Infect Dis. 2015; 15:29.

Llanes R, Reyes A, Rodríguez C, Guzmán D, Llop A. Factibilidad del uso del medio de cultivo base de Agar GC-Biocen en el Laboratorio de Microbiología. Rev Cubana Med Trop. 2004; 56(3):118-119.

Llanes R, Sosa J, Guzmán D, Llop A, Martínez I, Lantero MI et al. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Cuba (1995-99). Implications on Therapy of Gonorrhea. Sex Transm Dis. 2003; 30(1):10-14.

Lourenco A, Barros K, Meurer B, Longo S, Bonelli R. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: history, molecular mechanisms and epidemiological aspects of an emerging global threat. Braz J Microbiol. 2017; 48(4):617-628. [en internet]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2017.06.001>. Acceso 12.08.2017

Marrazzo JM, Apicella MA. 214 - *Neisseria gonorrhoeae* (Gonorrhea) In: Blaser JEBDJ, editor. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Eighth Edition. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2015. pp. 2446–2462.

Młynarczyk B, Kujawa M, Mleńczyk M, Młynarczyk G, Majewski S. Plasmid-mediated resistance to tetracyclines among *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Poland between 2012 and 2013. Postepy Dermatol Alergol. 2016; 33(6): 475–479.

Newman L, Rowley J, Vander Hoorn S, Wijesooriya NS, Unemo M, Low N, Stevens G, Gottlieb S, Kiarie J, Temmerman M. Global estimates of the prevalence and incidence of four curable sexually transmitted infections in 2012 based on systematic review and Global reporting. PLoS One. 2015;10(12): e0143304.10.

Pachulec E, Van der Does C. Conjugative Plasmids of *Neisseria gonorrhoeae*. PLoS One. 2010; 5(4): 9962.

Papp J, Schachter J, Gaydos CH, et al. Recommendations for the Laboratory-Based Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* — 2014. MMWR. 2014;63(2): 1-19.

Plan Estratégico Nacional para la prevención y control de las ITS y el VIH-sida en Cuba: 2014-2018. 226 pp. Minsap, 2013. <http://www.sld.cu/servicios/sida/> (Accedido: 04 de agosto de 2017).

QIAGEN® Protocols and Applications Guide. Plasmid Purification Handbook. 2011 [en internet]. Disponible en: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Sosa Puente J. Estudio de la resistencia a los Antimicrobianos y Caracterización Molecular en cepas de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas en Cuba. [Tesis doctoral]. Ciudad de la Habana: Instituto de Medicina Tropical “IPK”; 2002.

Starnino S and Dillon J. Laboratory Manual: Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of *Neisseria gonorrhoeae* for the Gonococcal Antimicrobial Susceptibility Surveillance Program in Latin America and the Caribbean. Saskatchewan, Canada; 2010.

Starnino S, Neri A, Stefanelli P. Molecular analysis of tetracycline-resistant gonococci: rapid detection of resistant genotypes using a real-time PCR assay. FEMS Microbiol Lett. 2008; 286:16–23.

Tapsall J. Surveillance of antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the WHO Western Pacific and South East Asian Regions, 2009. Commun Dis Intell Q Rep. 2011; 35(1):2-7.

Thakur S, Araya P, Borthagaray G, Galarza P, Llop A, Payares D, *et al.* Resistance to Ceftriaxone and Azithromycin in *Neisseria gonorrhoeae* Isolates From 7 Countries of South America and the Caribbean: 2010–2011. Sexually Transmitted Diseases. 2017; 44 (3): 157-160.

Turner A, Gough K R, Leeming J P. Molecular epidemiology of *tet M* genes in *Neisseria gonorrhoeae*. Sex Transm Inf. 1999; 75:60–66.

Unemo M, Dillon J. Review and international recommendation of methods for typing *Neisseria gonorrhoeae* isolates and their implications for improved knowledge of gonococcal epidemiology, treatment, and biology. Clin Microbiol Rev. 2011;24(3):447–458.

Unemo M, Golparian D, Sánchez-Busó L. The novel 2016 WHO *Neisseria gonorrhoeae* reference strains for global quality assurance of laboratory investigations: phenotypic, genetic and reference genome characterization. J Antimicrob Chemother. 2016; 71(11):3096-3108.

Unemo M, Rio C, Shafer W. Antimicrobial resistance expressed by *Neisseria gonorrhoeae*: a major global public health problem in the 21st century. Microbiol Spectr. 2016; 4(3): 10.1128.

Unemo M, Shafer W. Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: origin, evolution, and lessons learned for the future. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2011; 1230: E19–E28.

Unemo M, Shafer W. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future. Clin Microbiol Rev. 2014; 27(3):587–613

Weston EJ, Wi T, Papp J. Strengthening global surveillance for antimicrobial-resistant *Neisseria gonorrhoeae* through the Enhanced Gonococcal Antimicrobial Surveillance Program (EGASP). Emerg Infect Dis. 2017;23(1):47-52.

World Health Organization (WHO). Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Geneva: WHO; 2012 [en internet]. Disponible en: [http://wholibdoc.who.int/publications/2012/9789241503501\\_eng.pdf/..](http://wholibdoc.who.int/publications/2012/9789241503501_eng.pdf/) Acceso 18-11-2016.

World Health Organization (WHO). Guidelines for the Treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. Geneva: World Health Organization; 2016 [en internet]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK379221/>. Acceso 29-03-2017.

World Health Organization (WHO). La creciente resistencia a los antibióticos obliga a actualizar las recomendaciones sobre el tratamiento de las infecciones de transmisión sexual. La OMS publica nuevas directrices terapéuticas para la clamidiasis, la gonorrea y la sífilis. Ginebra: WHO. 2016 [en internet]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/antibiotics-sexual-infections/es/>. Acceso 29-03-2017.

World Health Organization. Report on global sexually transmitted infection surveillance— 2015. Geneva: The Organization; 2016.

Zhao S. Genetics of chromosomally mediated intermediate resistance to ceftriaxone and cefixime in *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob Ag Chemother. 2009; 53:3744-3751.

Zheng H, Wu Z, Huang J. The prevalence and epidemiology of plasmid-mediated penicillin and tetracycline resistance among *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Guangzhou, China, 2002–2012. BMC Infectious Dis. 2015; 15:412.

#### IV. ANEXOS

##### **Anexo 1.** Medio agar base GC y 1% de suplemento enriquecedor

|                                |      |
|--------------------------------|------|
| Peptona                        | 15,0 |
| Almidón de maíz                | 1,0  |
| Dipotassium hydrogen phosphate | 4,0  |
| Potassium dihydrogen phosphate | 1,0  |
| NaCL                           | 5,0  |
| Agar                           | 10,0 |

- Pesar 18,0 g de agar base GC y resuspender en 495 mL de agua destilada.
- Calentar hasta disolver el polvo completamente. Usar barra y agitador magnético. - Tapar el Erlenmeyer con tapón de algodón.
- Esterilizar el medio en autoclave a 15 Lbs/pulgada durante 15 min y a 121° C.
- Enfriar el medio en baño de agua a 50-55° C.
- Adicionar asépticamente al medio de cultivo 5 mL de suplemento enriquecedor Isovitallex u otro similar (Vitox), mezclar y distribuir en placas de Petri estériles (25 mL por placas de 100 x 15 mm). Permitir que el medio solidifique a la temperatura ambiente. Invertir las placas y almacenarlas en bolsas de nylon a 4 °C.