

T 579.61

FUE
div

BIBLIOTECA UCM



5306071795

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Biológicas



DIVERSIDAD GENETICA Y RELACIONES ENTRE POBLACIONES
DE *NEISSERIA GONORRHOEAE*

R. 23.024

TESIS DOCTORAL

Laura De La Fuente Cuello

Madrid 1992

Esta tesis ha sido realizada en el Servicio de Bacteriología del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III por Laura De La Fuente Cuello, bajo la dirección del Dr Julio A. Vázquez Moreno, facultativo del mencionado Servicio, y ha tenido como ponente a la Dra Josefina Rodríguez de Lecea, Profesora titular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.

Vº Bº

El Director de la Tesis



Fdo.: Julio A. Vázquez Moreno



Fdo.: Laura De La Fuente

A JOSE Y A MIS HIJOS
A MIS PADRES Y HERMANO

IV

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

De forma especial a Julio A. Vázquez, director de esta tesis, por su inestimable apoyo en la realización de este trabajo, así como por haberme permitido compartir con él un tema al que ha hecho grandes aportaciones durante muchos años; así mismo quiero agradecerle la confianza que siempre ha depositado en mí y la amistad que me ha brindado.

Al Dr Juan A. Sáez Nieto, Jefe del Servicio de Bacteriología del CNMVIS, por el estímulo y apoyo que me ha demostrado en los momentos de mi *vida profesional que más lo he necesitado.*

Al Dr J. Casal Lombos (Director del CNMVIS durante el periodo de realización de esta tesis), actualmente Jefe del Departamento, por haberme permitido llevar a cabo este trabajo.

Al Dr M. Viñas por su gran ayuda en la puesta en marcha del tratamiento informático del análisis multienzimático.

A la Dra J. Rodriguez de Lecea por haber accedido a ser la ponente de esta tesis.

A todos los compañeros del Servicio de Bacteriología por los momentos vividos a lo largo de estos años. Quiero agradecer de manera especial:

A Sonsoles Berrón, amiga y compañera, los buenos ratos pasados en la puesta en marcha de la electroforésis de isoenzimas, así como sus opiniones y el cariño y amistad que siempre me ha dado.

A Carmen Marcos, por los momentos que hemos compartido juntas, convirtiéndose en verdadera amiga, por su ánimo y apoyo constante.

V

A Elena Martín, por su ayuda desinteresada en la realización de este trabajo.

A todos los compañeros de los diferentes centros sanitarios que han enviado cepas, sin las que esta tesis no habría podido realizarse.

A Felipe Navarro por su interés y colaboración que ha permitido poner una "nota de color" en esta tesis.

A Gabriel Jiménez, de la Sección de Fotografía del Centro Nacional de Alimentación del Instituto Carlos III que ha realizado el trabajo fotográfico.

Por último quiero reseñar que parte de esta tesis ha sido realizada con una ayuda FIS 91/0116.

..... **INDICE**

INTRODUCCION	1
1. POSICION TAXONOMICA	2
1.1 Características del género <i>Neisseria</i>	2
1.2 Diferenciación de las especies del género <i>Neisseria</i>	6
1.2.1 Diferenciación bioquímica	6
1.2.2 Hibridación de ADN	7
1.2.3. Análisis de isoenzimas	8
1.2.4. Aglutinación con lectinas	11
1.2.5. Otros métodos de identificación de <i>N. gonorrhoeae</i> .	12
2. CARACTERIZACION DE LA ESPECIE NEISSERIA GONORRHOEAE	14
2.1 Estructura antigénica	14
2.1.1 Antígenos capsulares	14
2.1.2 Pili	14
2.1.3 Lipopolisacárido	15
2.1.4 Proteínas de la membrana externa	16
2.2 Métodos de caracterización de las cepas de <i>N. gonorrhoeae</i>	18
2.2.1 Auxotipia	18
2.2.2 Serotipia	22
2.2.3 Plasmidotipia	27
3. SENSIBILIDAD DE NEISSERIA GONORRHOEAE A LOS ANTIMICROBIANOS	29
3.1 Tratamientos antimicrobianos más utilizados frente a la gonorrea	30
3.2 Sensibilidad frente a penicilina	32
3.2.1 Mecanismos de resistencia	34
3.2.2 Distribución geográfica de las cepas resistentes	36
3.3 Sensibilidad frente a Tetraciclina	37
3.3.1 Mecanismos de Resistencia	37
3.3.2 Distribución geográfica de la resistencia a Tetraciclina	38

VIII

3.4	Sensibilidad frente a Espectinomicina	39
3.4.1	Mecanismos de Resistencia	39
3.4.2	Distribución geográfica de la resistencia a espectinomicina	39
3.5	Sensibilidad frente a cefalosporinas	40
3.5.1	Mecanismos de resistencia	40
3.5.2	Distribución geográfica de la resistencia a cefalosporinas	41
3.6	Sensibilidad frente a quinolonas	41
3.6.1	Mecanismos de resistencia	41
3.6.2	Distribución geográfica de la resistencia a quinolonas	41

OBJETIVOS	43
------------------	-----------

MATERIAL Y METODOS	47
---------------------------	-----------

1.	CEPAS DEL GENERO NEISSERIA	48
1.1	Cepas de Neisseria gonorrhoeae	48
1.1.1	Procedencia de las cepas	48
1.1.2	Transporte, crecimiento y conservación de las cepas	50
1.2	Otras cepas del género Neisseria	51
1.2.1	Procedencia de las cepas	51
1.2.2	Transporte, crecimiento y conservación de las cepas	54
2.	PRUEBAS DE IDENTIFICACION Y CONFIRMACION	56
2.1	Prueba citocromo-oxidasa	56
2.2	Prueba de la catalasa	56
2.3	Prueba de superoxol	57
2.4	Utilización de azúcares	57
2.5	Detección de β -galactosidasa	58
2.6	Detección de γ -glutamyl-aminopeptidasa	58
2.7	Producción de polisacárido de sacarosa	59
2.8	Coaglutinación	59

3. SEROTIPADO DE LAS CEPAS DE NEISSERIA GONORRHOEAE .	61
3.1 Serotipia frente a la proteína I	61
3.2 Serovariedades	61
4. AUXOTIPADO DE LAS CEPAS DE NEISSERIA GONORRHOEAE	63
4.1 Medio completo, químicamente definido	63
4.1.1 Preparación de las soluciones	63
4.1.2 Preparación del agar	70
4.2 Medios defectivos	70
4.3 Inoculación, lectura e interpretación de los resultados .	70
5. ANALISIS DE PLASMIDOS DE NEISSERIA GONORRHOEAE . . .	73
5.1 Extracción de los plásmidos	73
5.2 Electroforesis en gel de agarosa	74
6. SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS DE NEISSERIA GONORRHOEAE	76
6.1 Detección de β -lactamasa	76
6.2 Concentraciones Míminas Inhibitorias (CMIs)	76
6.2.1 Antibióticos	76
6.2.2 Medio, inoculación y determinación de la CMI	77
7. ANALISIS DE ISOENZIMAS	78
7.1 Preparación de los extractos bacterianos	78
7.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida	79
7.2.1 Preparación de los geles	79
7.2.2 Desarrollo de la Electroforesis	80
7.3 Tinción de los geles	81
7.4 Lectura e interpretación de los geles	84
7.5 Análisis estadístico de los datos	85
RESULTADOS	86
1. SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS	87
1.1 Distribución anual de cepas de <i>N. gonorrhoeae</i> con resistencia	87
1.1.1 Sensibilidad a penicilina	87
1.1.2 Resistencia a Tetraciclina	91

1.1.3 Sensibilidad frente a espectinomicina	93
1.1.4 Sensibilidad frente a Cefoxitina	93
1.1.5 Sensibilidad frente a Ceftazidima	94
1.1.6 Sensibilidad frente a ceftriaxona	94
1.1.7 Sensibilidad frente a ciprofloxacina	97
1.2 Distribución geográfica	101
1.2.1 Resistencia a penicilina	101
1.3 Correlación de la sensibilidad frente a penicilina con la obtenida frente a otros antimicrobianos	104
2. SEROVARIEDADES	106
2.1 Distribución global de serotipos IA y IB	106
2.2 Determinación de serovariedades	106
2.2.1 Distribución anual	109
2.2.2 Distribución geográfica	114
3. AUXOTIPIA	125
3.1 Distribución global de auxotipos	125
3.2 Distribución anual de auxotipos	125
3.3 Distribución geográfica	125
4. ANALISIS DE PLASMIDOS EN CEPAS PRODUCTORAS DE PENICILINASA	129
4.1 Distribución temporal de los diferentes perfiles plasmídicos	129
5. ANALISIS MULTIENZIMATICO	132
5.1 Estudio inter-específico en el género Neisseria	132
5.1.1 Diversidad genética	135
5.1.2 Relaciones genéticas entre las diferentes especies	143
5.2 Aplicación de isoenzimas en <i>N. gonorrhoeae</i>	146
5.2.1 Análisis multienzimático en cepas con resistencia cromosómica	146
5.2.1.1 Diversidad genética	149
5.2.1.2 Relaciones genéticas entre los distintos genotipos	149
5.2.1.3 Distribución geográfica	153

5.2.2	Análisis multienzimático en cepas productoras de penicilinasa	156
5.2.2.1	Diversidad genética	156
5.2.2.2	Relaciones genéticas entre los distintos genotipos	157
6.	RELACIONES ENTRE LOS DIFERENTES MARCADORES FENOTIPICOS Y GENOTIPICOS UTILIZADOS	159
6.1	Clases Auxotipo/Serovariedad (A/S)	159
6.1.1	Distribución de Clases (A/S) entre las cepas con resistencia antimicrobianos	159
6.2	Combinación del Análisis Multienzimático con la Auxotipia y las Serovariedades	169
6.2.1	Serovariedades y Tipos Electroforéticos	169
6.2.2	Auxotipos y Tipos Electroforéticos	176
6.2.3	Clases (A/S) y Tipos Electroforéticos	176
DISCUSION		182
1.	ESTUDIO FILOGENETICO DEL GENERO NEISSERIA. UBICACION DE LA ESPECIE N. GONORRHOEAE MEDIANTE ANALISIS MULTIENZIMATICO.	183
2.	ESTADO ACTUAL DE LA RESISTENCIA DE N. GONORRHOEAE FRENTE A ANTIMICROBIANOS EN ESPAÑA.	187
3.	APLICACION DE MARCADORES FENOTIPICOS; AUXOTIPIA Y DETERMINACION DE SEROVARIEDADES	194
4.	ANALISIS DE LAS CEPAS DE N. GONORRHOEAE PRODUCTORAS DE PENICILINASA MEDIANTE PLASMIDOTIPIA Y ANALISIS MULTIENZIMATICO	198
5.	APLICACION DEL ANALISIS MULTIENZIMATICO EN LOS GRUPOS DE CEPAS DE GONOCOCO CON DIFERENTES NIVELES DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS	200
CONCLUSIONES		205
BIBLIOGRAFIA		210
APENDICE		228

..... INTRODUCCION

1. POSICION TAXONOMICA

1.1 Características del género *Neisseria*.

Los microorganismos del género *Neisseria* pertenecen a la familia *Neisseriaceae* en la cual también están incluidos *Moraxella*, *Kingella* y *Acinetobacter*.

El género *Neisseria* está constituido por bacterias cocáceas Gram negativas de 0.6-1.5 μm de diámetro, que aparecen normalmente en parejas con los lados adyacentes aplanados. No producen esporas y son inmóviles. Algunas especies son capsuladas. Muchas de las especies del género presentan unos complejos requerimientos nutritivos para su crecimiento. La temperatura óptima de crecimiento es de 35-37° C, utilizando un reducido número de carbohidratos. Son aerobios o anaerobios facultativos. Poseen actividad de catalasa y citocromo-oxidasa excepto *Neisseria elongata*, y su proporción de G+C en el DNA es de 46.5-53.5 mol %.

Las especies que forman parte del género *Neisseria* son: *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N. lactamica*, *N. sicca*, *N. subflava*, *N. flavescens*, *N. mucosa*, *N. cinerea*, *N. denitrificans*, *N. elongata*, *N. canis* y *N. polysaccharea* (Bovre, 1984).

De todas ellas salvo *N. meningitidis*, agente causal de la meningitis cerebro espinal epidémica y de septicemias, y *N. gonorrhoeae* causante de la gonorrea, el resto se pueden considerar microorganismos oportunistas y en raras ocasiones producen patologías en el hombre.

Neisseria meningitidis

Neisseria meningitidis (meningococo) es el agente causal de la meningitis cerebro espinal epidémica. Es parásito obligado del hombre. El meningococo se aísla frecuentemente de exudados faríngeos y nasofaríngeos de

personas sanas (portadores), constituyendo un importante reservorio.

El meningococo puede aislarse de diferentes localizaciones como líquido cefalorraquídeo, sangre, exudados nasofaríngeos, esputos, etc. También se han descrito aislamientos de *N. meningitidis* en uretra, cervix y recto (Faur y cols., 1981; Hook III y Hansfield, 1990). Los meningococos se clasifican serológicamente en función de la presencia de distintos polisacáridos capsulares. Actualmente se reconocen distintos serogrupos A, B, C, H, I, K, L, X, Y, Z, 29E y W135 (Morello y Bonhoff, 1980).

Neisseria lactamica

Raramente patógena, se aísla frecuentemente de nasofaringe especialmente en niños y ocasionalmente de tracto genital (Telfer Brunton y cols., 1980).

La mayoría de las cepas de *N.lactamica* son autoaglutinables. Presentan así mismo reactividad cruzada con sueros antimeningocócicos (Gold y cols., 1978; Sáez Nieto y cols., 1982).

Neisseria sicca

Se puede aislar de nasofaringe y rara vez se comporta como patógeno, aunque se han descrito casos de infecciones, tales como meningitis (Bansmer y Brem, 1948), endocarditis (Gay y Sevier, 1978) etc.

Neisseria subflava

Forma parte también de la flora normal faríngea, aunque así mismo ha sido aislada de pacientes con meningitis y sepsis (Herbert y Ruskin, 1981),

endocarditis (Scott, 1971).

Neisseria mucosa

Al igual que el resto de las neiserias saprofitas, ocasionalmente está involucrada en procesos infecciosos. Existen casos descritos de meningitis, endocarditis y pericarditis (Fainstain y cols., 1978; Hennessey y cols., 1981).

Neisseria flavescens

Normalmente neiseria comensal. Esporádicamente ha producido casos de meningitis y sepsis (Prentice, 1957).

Neisseria cinerea

Es una de las especies que recientemente ha generado un notable interés, principalmente porque puede confundirse fácilmente con *N. gonorrhoeae*. Forma parte de la flora del tracto respiratorio superior aunque también ha sido aislada en tracto genital (Knapp y cols., 1988) y en un paciente con proctitis (Dossett y cols., 1985).

Neisseria elongata

Se presenta en forma de bacilos cortos de 0.5 mm de diámetro, a menudo como diplobacilos o en cadenas cortas, no es capsulada, es inmóvil y puede presentar fimbrias. No presenta actividad de catalasa. Se ha aislado de farínge de individuos sanos y de casos de faringitis, también de aspirados bronquiales y tracto urinario (Bovre, 1984).

Neisseria polysaccharea

Es una especie descrita recientemente (Riou y Guibourdenche, 1983), que se ha aislado de exudados faríngeos de portadores sanos y su importancia reside en que puede ser confundida con el meningococo (Boquete y cols., 1986).

Neisseria denitrificans

Es comensal del tracto respiratorio superior de los animales (Pérez y cols., 1989).

Neisseria gonorrhoeae

Es el agente productor de la gonorrea en el hombre; se aísla fundamentalmente a partir de exudados del aparato genital y en los casos de infección gonocócica diseminada se ha aislado de sangre, lesiones de la piel, líquido cefalorraquídeo, etc. En función de los hábitos sexuales también pueden aislarse a partir de exudados anorrectales y orofaríngeos.

El gonococo es muy sensible a las variaciones ambientales, como son temperaturas extremas y desecación; esto implica que no pueden sobrevivir mucho tiempo fuera del huésped, por lo que la principal vía de transmisión es por contacto directo entre individuos sobre todo por contacto sexual.

En los cultivos en medio sólido pueden observarse cuatro tipos de colonias morfológicamente distintas denominadas T1, T2, T3 y T4 (Kellogg y cols., 1963); en los cultivos primarios aparecen fundamentalmente colonias de tipo T1 y T2 en aislamientos de infecciones del tracto genitourinario, además en dichas colonias predominan los gonococos piliados, mientras que los gonococos no piliados aparecen en las colonias tipo T3 y T4 que se obtienen en subcultivos o

bien en cultivos primarios de localizaciones extragenitales.

Los métodos de caracterización de las cepas de *N. gonorrhoeae* los veremos más adelante en el apartado 2.2.

1.2 Diferenciación de las especies del género *Neisseria*

1.2.1 Diferenciación bioquímica

El aislamiento de gonococos de localizaciones en las que normalmente se encuentran también una gran variedad de microorganismos saprofitos (farínge, mucosa anorectal, cervix, etc.) ha sido un problema que se solucionó con el empleo de medios que contenían agentes antimicrobianos que inhibían la gran mayoría de las neiserias no patógenas así como flora acompañante (estafilococos, estreptococos etc.), pero que permitían el crecimiento de los gonococos.

El medio selectivo más empleado ha sido el descrito por Thayer y Martin en 1966, que consiste en un agar chocolate, un suplemento químico (Wite y Kellogg, 1965) y los antibióticos vancomicina, colistina y nistatina para eliminar la flora acompañante. El aislamiento de zonas que normalmente son estériles (sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial etc.) se puede realizar en agar chocolate sin antibióticos. En la Tabla 1 se resumen algunos de los criterios de identificación de las especies del género *Neisseria*.

El crecimiento de los gonococos en el medio de Thayer-Martin (TM) es una característica utilizada en la diferenciación con otras neiserias saprofitas; sin embargo hay que tener en cuenta que *N. meningitidis*, *N. lactamica* y *N. polysaccharea* también son capaces de crecer en ese medio, y puesto que han sido aisladas de las mismas localizaciones que *N. gonorrhoeae* (Hollis, 1973; Faur y cols., 1981) es muy importante su diferenciación.

En el caso de *N. lactamica*, la producción de ácido con lactosa y la

posesión de β -galactosidasa que hidroliza la lactosa y el sustrato cromogénico o-nitrophenil- β -D-galacto-piranósido (ONPG), son características suficientes para diferenciarlas de los gonococos.

La propiedad fundamental para diferenciar *N. polysaccharea* de los gonococos es la producción de polisacárido de sacarosa por parte de la primera.

En cuanto a la correcta identificación de *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*, puede ser mas complicada dado que se han descrito meningococos que no producen ácido con maltosa, además de otras cepas atípicas en la producción de ácido con glucosa tanto entre los gonococos como en los meningococos (Sáez Nieto y cols., 1982). Por este motivo se han introducido dos pruebas adicionales, que son actividad de aminopeptidasa y test de superoxol.

1.2.2 Hibridación de ADN

Los ensayos realizados para la determinación de la composición de bases en el ADN , estudios de transformación e hibridación de ADN (Hoke y Vedros, 1982; Riou y Guibourdenche, 1987), han servido para clarificar la posición taxonómica de las distintas especies del género *Neisseria*.

Los resultados que se obtienen sugieren que las neiserias se dividen en dos grupos genéticos (Tabla II). Estos grupos están constituidos en función de la composición de bases del ADN, nivel de transformación entre las especies del grupo, y grado de hibridación de ADN que se produce entre los miembros de un mismo grupo y los de otros grupos.

El grupo I estaría formado por *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *N. cinerea*, *N. lactamica* y *N. polysaccharea*; caracterizado por un valor de G + C de 50.5-53.2 mol %, un elevado nivel de transformación entre los miembros del grupo, así como un alto grado de hibridación del ADN (por encima del 60 %) entre las especies de este grupo, siendo sin embargo muy bajo con los miembros del grupo II (menos del 46 %).

TABLA I. CARACTERIZACION DE LAS ESPECIES
DEL GENERO *NEISSERIA*

	<i>N. meningitidis</i>	<i>N. polysaccharae</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>N. cinerea</i>	<i>N. lactamica</i>	<i>N. sicca</i>	<i>N. mucosa</i>	<i>N. flavescens</i>	<i>N. subflava</i>	<i>N. elongata</i>	<i>N. denitrificans</i>
Morfología	c	c	c	c	c	c	c	c	c	b	c
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Superoxol	N	-	+	-	N	-	V	V	N	-	-
Producción de:											
Glucosa	+	+	+	N	+	+	+	-	+	-	+
Maltosa	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
Lactosa	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	-	+	+	-	V	-	+
Fructosa	-	-	-	-	-	+	+	-	V	-	+
Crecimiento en:											
Thayer-Martin	+	+	+	V	+	-	-	-	N	-	-
Agar Sangre 22°C	-	-	-	V	V	V	+	+	V	+	+
Agar Nutritivo 35°C	-	-	-	+	+	+	+	+	V	+	+
Enzimas:											
γ-glutamylaminopeptidasa	+	-	-	-	-	-	V	-	N	-	-
Protilaminopeptidasa	V	V	+	+	+	+	+	+	+	V	-
ONPG	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Reducción de:											
Nitratos	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Nitritos	V	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Polisac. de sacarosa	-	+	-	-	-	+	+	+	V	-	+
Resistencia a colistina	+	+	+	-	+	-	-	-	N	-	-

V: variable; N: negativo con excepciones ocasionales.

En el grupo II se incluyen *N. flavescens*, *N. sicca*, *N. subflava*, *N. flava*, *N. perflava*, *N. mucosa*, *N. denitrificans* y *N. elongata* en el que el porcentaje de G + C es de 49.3-55.6 mol % y el grado de hibridación de ADN con las especies del grupo I es del 20-46 %, en cambio entre los miembros del grupo este valor es superior al 78 %.

1.2.3. Análisis de isoenzimas

El análisis electroforético de enzimas ha sido un método ampliamente utilizado en estudios de genética de poblaciones de los organismos eucarióticos (Nei, 1975; Ayala, 1976).

Las técnicas que se emplean mas frecuentemente en estudios taxonómicos y epidemiológicos como son la biotipia, fagotipia, serotipia, electroforésis de proteínas totales etc., detectan exclusivamente variabilidad fenotípica, lo cual implica grandes problemas para relacionar la variación alélica con dicha variación fenotípica, además de no suministrar información acerca de la frecuencia de alelos, aspecto necesario en el estudio de la genética de poblaciones.

Técnicas como la hibridación de ADN contribuyen muy poco al conocimiento de la variedad genética dentro de las especies debido a la complejidad experimental, distorsiones provocadas por el ADN extracromosómico etc.

La carga eléctrica neta de una proteína depende de su secuencia de aminoácidos, por lo tanto es un reflejo de la secuencia de bases en el correspondiente gen estructural. Como consecuencia cuando se detectan diferentes movilidades electroforéticas de un mismo enzima se puede asumir que corresponden a un alelo distinto del gen estructural que codifica ese enzima. La electroforésis en gel puede detectar entre el 80 y el 90 % de las sustituciones de aminoácidos, es decir la sustitución de un aminoácido en la molécula de un enzima, probablemente si modificará su movilidad electroforética (Selander y cols., 1986)

TABLA II. RELACION GENETICA DE LAS ESPECIES DEL GENERO *NEISSERIA* EN FUNCION A LA COMPOSICION DE BASES DEL ADN E HIBRIDACION DEL ADN.

Grupo	Especies	ADN bases mol %	Hibridación con miembros del grupo	
			I	II
I	<i>N. gonorrhoeae</i>			
	<i>N. meningitidis</i>			
	<i>N. lactamica</i>	50.5-53.2	≥60 ^a	≤46
	<i>N. cinerea</i>			
	<i>N. polysaccharea</i>			
II	<i>N. flavescens</i>			
	<i>N. sicca</i>			
	<i>N. subflava</i>			
	<i>N. flava</i>	49.3-55.6	20-46	≥78
	<i>N. perflava</i>			
	<i>N. mucosa</i>			
	<i>N. denitrificans</i>			
	<i>N. elongata</i>			

a Porcentaje de hibridación

Para determinar la diversidad genética en los loci que se vayan a estudiar, es necesario conocer las frecuencias de los distintos alelos (en este caso el término alelo es equivalente a electromorfo). Estas frecuencias se calculan a partir del total de Tipos electroforéticos (diferentes perfiles de electromorfos) encontrados en la población analizada.

Cada aislado se caracteriza por su combinación de electromorfos sobre el número de enzimas ensayadas; los distintos perfiles de electromorfos que corresponden a un único genotipo se designan como ya hemos dicho tipos electroforéticos (TE), que son equivalentes a los perfiles alélicos.

El estudio de la variabilidad genética a partir de la determinación de patrones electroforéticos enzimáticos ha permitido realizar numerosos ensayos de genética de poblaciones en bacterias de indudable interés clínico: *E. coli* (Achtman y cols., 1986), *N. meningitidis* (Caugant y cols., 1986), *H. influenzae* (Musser y cols., 1986) etc.

Los isoenzimas han contribuido a ampliar el grado de conocimiento acerca de la regulación metabólica en bacterias, plantas y animales.

Existen diversas causas de la multiplicidad enzimática, tradicionalmente definidas como causas primarias o genéticas y causas secundarias o postranscripcionales. Las primeras son el resultado de variaciones en la secuencia de nucleótidos del gen o genes responsables de la síntesis del enzima, mientras que los isoenzimas postranscripcionales son consecuencia de las modificaciones del mecanismo de regulación, una vez sintetizado el enzima.

1.2.4. Aglutinación con lectinas

Las lectinas son aglutininas de animales y plantas capaces de unirse a una amplia variedad de sustancias microbianas. La utilización de lectinas ha ido en aumento debido a la capacidad que presentan para reaccionar con una gran variedad de moléculas que contengan carbohidratos simples o complejos,

pu diéndose obtener información acerca de los carbohidratos de la superficie celular de las bacterias Gram+ y Gram-.

Se han empleado para detectar modificaciones en la pared celular, analizar variaciones en la composición de carbohidratos de la pared celular dentro de las especies etc. (Pistole, 1981).

En un estudio realizado con diferentes especies del género *Neisseria*, utilizando un panel de 22 lectinas diferentes (Doyle y cols., 1984), se observa que además de los gonococos y los meningococos, otros miembros de la familia *Neisseriaceae* interaccionan con las lectinas; *N. lactamica* se muestra especialmente reactiva, mientras que *N. sicca* no aglutina con ninguna de las lectinas ensayadas.

En un trabajo posterior se ha llevado a cabo la caracterización de *N. gonorrhoeae* en base a la reactividad con 14 lectinas distintas (Schalla y cols., 1985).

En conclusión podrí a decirse que la aglutinación con lectinas puede ser un método válido de apoyo en la identificación de especies dentro del género *Neisseria*, así como marcador epidemiológico para tipificar cepas de *N. gonorrhoeae*, sobre todo en aquellos casos en los que la utilización de otros marcadores no discrimina suficientemente (Vázquez y Berrón, 1990).

1.2.5. Otros métodos de identificación de *N. gonorrhoeae*.

Los métodos inmunológicos ofrecen grandes ventajas a la hora de confirmar la identificación de los gonococos, como son la rapidez y la utilización de pequeñas cantidades de crecimiento bacteriano. Estos factores unidos a las dificultades que se presentan a veces en la utilización de carbohidratos, han estimulado el desarrollo de estos métodos inmunológicos.

a. Anticuerpos policlonales

Métodos como la inmunofluorescencia directa (FDA) y coaglutinación (CoA) han sido ampliamente utilizados en la identificación de los gonococos.

El primer método utilizado fue la FDA, sin embargo la CoA es más sencilla de realizar y la interpretación es más fácil (Young y McMillan, 1982). En la CoA se utiliza proteína A de estafilococo con anticuerpos antigonocócicos de conejo unido por el fragmento Fc a la proteína A (Danielsson y Kronvall, 1974).

La CoA reemplazó a la FDA en la mayoría de los laboratorios, fundamentalmente porque se producen reacciones cruzadas con *N. lactamica*, siendo por lo tanto un método desechable en la identificación de gonococos de aislados faríngeos.

b. Anticuerpos monoclonales

Actualmente la utilización de CoA empleando anticuerpos monoclonales ha desplazado totalmente los ensayos con anticuerpos policlonales, siendo éstos sustituidos por anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos a epítomos de la proteína I de la membrana externa de los gonococos.

Existen varios sistemas comerciales con una excelente sensibilidad y especificidad, sin embargo en evaluaciones realizadas de los mismos, se describen reacciones cruzadas con *N. lactamica*, algunas cepas de *Branhamella catarrhalis* y sobre todo con *N. cinerea* (Dillon y cols., 1988).

Por lo tanto, con el fin de conseguir una correcta identificación de *N. gonorrhoeae*, se deben llevar a cabo una serie de pruebas adicionales como son la utilización de azúcares, hidrólisis de ONPG, resistencia a colistina etc.

2. CARACTERIZACION DE LA ESPECIE *NEISSERIA GONORRHOEAE*

2.1 Estructura antigénica

La estructura de la pared de los gonococos es la típica de las bacterias Gram negativas, la membrana externa, la membrana citoplásmica que rodea al citoplasma bacteriano y entre ellas el espacio periplásmico en el que se encuentra el peptidoglicano. La membrana externa consiste en un complejo mosaico de proteínas, lipopolisacárido y fosfolípidos unidos estrechamente entre sí. Estas moléculas de la superficie celular juegan un importante papel en la colonización bacteriana, en la infección, así como en la resistencia de los gonococos a las defensas naturales o inducidas del huésped.

2.1.1 Antígenos capsulares

El gonococo no expresa una verdadera capsula de polisacárido, y aunque hay autores que argumentan la existencia de la misma (James y Swenson, 1977; Hendley y cols., 1981), no se ha realizado nunca aislamiento y purificación de material capsular.

Los gonococos producen una " pseudocapsula" de polifosfatos que podría realizar algunas de las funciones atribuidas a las capsulas de polisacárido (Noegel y Gotschlich, 1983). Sin embargo el papel de esta pseudocapsula en la biología y patogénesis de los gonococos es por el momento desconocida.

2.1.2 Pili

Los pili son apéndices no flagelares que se encuentran en la superficie, formados por subunidades proteicas idénticas que se unen dando lugar a largos polímeros. El peso molecular de cada subunidad oscila entre 17.000-22.000 daltons dependiendo de las cepas (Buchanan, 1975).

Los gonococos piliados predominan en las colonias tipo T1 y T2 (colonias obtenidas de cultivos primarios), aisladas de infecciones del tracto genitourinario, mientras que en las colonias tipo T3 y T4 aparecen gonococos no piliados y se obtienen en subcultivos o bien en cultivos primarios de localizaciones extragenitales.

Los pili de *N. gonorrhoeae* sufren dos tipos de variaciones, antigénica y de fase.

La variación de fase se refiere a la expresión reversible entre dos estados alternativos, producción de células piliadas (P^+) o no (P^-) (Britigan y cols., 1985). Esta variación se presenta con una alta frecuencia.

La variación antigénica, igualmente, se presenta con una alta frecuencia. La molécula de un pili puede dividirse en tres regiones: una constante en la que la secuencia de aminoácidos es altamente conservada, una semivariable en la cual se producen muchas variaciones de aminoácidos y una altamente variable cerca de la zona carboxi terminal (Schoolnik y cols., 1984).

Los gonococos piliados presentan mayor capacidad de adherencia a las superficies mucosas del huésped y son más virulentos (McGee y cols., 1981).

2.1.3 Lipopolisacárido

En la superficie celular todos los gonococos poseen un lipooligosacárido (LOS), similar al lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram-.

El LOS está formado por un lípido A y un core polisacárido constituido por ácido cetodeoxioctanoico (KDO), heptosa, glucosa, galactosa, glucosamina y/o galactosamina (Griffiss y cols., 1988).

Atendiendo a criterios químicos e inmunológicos existen en la

naturaleza variaciones en los azúcares del core del LOS, dicha variación antigénica es la base del esquema de serotipia de Apicella (Apicella y cols., 1987). Esta variabilidad antigénica está relacionada con la resistencia relativa que ciertas cepas de *N. gonorrhoeae* presentan a la actividad bactericida del suero y quizás relacionada también con la manifestación clínica y severidad de la infección gonocócica (Apicella y cols., 1986).

2.1.4 Proteínas de la membrana externa

Como hemos dicho anteriormente la membrana externa de los gonococos contiene lipooligosacárido, fosfolípidos y una variedad de proteínas, de las que las más importantes son la Proteína I, la Proteína II y la III.

La Proteína I tiene un peso molecular de 32-36 Kd; en su estado nativo aparece como un trímero, se encuentra físicamente próxima en la membrana externa al LOS y también a la Proteína III (Newhall y cols., 1980). Funciona como una porina y se piensa que juega un papel importante en la patogénesis.

La Proteína I se presenta en dos clases distintas desde el punto de vista químico e inmunológico, designadas como PIA y PIB. Una cepa puede poseer, ya sea la PIA o PIB pero nunca las dos.

Se han desarrollado esquemas de serotipia con anticuerpos monoclonales basados en la Proteína I, que estudiaremos mas ampliamente en el apartado 2.2.2. Los genes que codifican para la PIA y PIB son alelos de un mismo locus.

Proteína II es el término empleado para designar a un grupo de proteínas relacionadas entre sí, con un peso molecular de 20-28 Kd. Las colonias de *N. gonorrhoeae* que carecen de Proteína II son transparentes, mientras que aquellas que poseen uno o más tipos de Proteína II son opacas (Swanson, 1982).

En contraste con la Proteína I, la Proteína II puede variar en cantidad

o bien estar ausente en un aislado e incluso se pueden expresar hasta seis variantes de la misma.

La Proteína III, con un peso molecular de 30-31 Kd, está presente en todos los gonococos en estrecha asociación con la Proteína I y el LOS, y presenta una variación antigénica muy pequeña entre las cepas, (Blake y Gotschlich, 1983).

La Proteína H8 es un antígeno definido recientemente y que se encuentra en todas las cepas de *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* así como en *N. lactamica* y *N. cinerea* pero no en las neiserias saprofitas (Cannon y cols., 1984).

La Proteína H8 es antigenicamente homogénea independientemente de la presencia o ausencia de pili, el tipo de colonia, opaca o transparente, y todas las cepas tienen en común uno o más epítomos de este antígeno expuestos en la superficie.

Durante la convalecencia de la infección gonocócica se producen anticuerpos frente a la Proteína H8 (Black y cols., 1985), pero su papel en la patogénesis es por el momento desconocido.

En la membrana externa se han encontrado también otras proteínas, muchas de las cuales no han sido completamente caracterizadas en cuanto a su estructura y función. Por ejemplo existen una serie de proteínas que solo se expresan bajo ciertas condiciones incluyendo la ausencia de hierro, crecimiento anaeróbico o otras situaciones límite de crecimiento (West y Sparling, 1985; Clark y cols., 1987).

Dentro de este grupo de proteínas reguladoras de hierro se encuentra una de 37 Kd y varias dentro de un rango de 65-100Kd (Mietzner y cols., 1984). La proteína de 37 Kd ha sido bien definida químicamente y se piensa que puede intervenir en el transporte de hierro. Se ha encontrado en todos los gonococos y meningococos.

Igualmente ha sido definida una proteína de 70 Kd común en *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*. Cepas mutantes en las que no está presente dicha proteína son incapaces de transportar hierro a partir de diversas fuentes incluyendo la transferrina y la lactoferrina, con lo cual se piensa que igualmente desempeña un papel en el transporte de hierro.

Así mismo todos los gonococos y meningococos producen una proteasa que reconoce como único sustrato el suero y la IgA1 secretora (Mulks y Plant, 1978). Son enzimas proteolíticas que inactivan a la subclase IgA1 de la fracción IgA, que representa el principal tipo de anticuerpos encontrados en membranas mucosas. Esta inactivación podría constituir un paso más en la patogénesis de la infección gonocócica (Hook y Holmes, 1985).

2.2 Métodos de caracterización de las cepas de *N. gonorrhoeae*

2.2.1 Auxotipia

La auxotipia ha sido el primer método utilizado para tipar las cepas de gonococo; fue desarrollada por Catlin en 1973.

Consiste en el empleo de un medio químicamente definido libre de proteínas en el que se omite la adición de aminoácidos (por ejemplo prolina, arginina o metionina), bases nitrogenadas (como uracilo e hipoxantina) y/o vitaminas como tiamina, de forma que al examinar si se produce crecimiento de los gonococos es posible clasificarlos en distintos grupos (auxotipos) de acuerdo a sus requerimientos nutricionales. En la Tabla III se describen los auxotipos definidos actualmente.

El auxotipo al que pertenece una cepa se expresa de la siguiente forma: por ejemplo, Pro⁻ son cepas que requieren prolina para su crecimiento; Arg⁻/Hyx⁻/Ura⁻ cepas que requieren arginina, hipoxantina y uracilo. Las cepas que no presentan ningún requerimiento para su crecimiento se denominan prototróficas (Prototr. o Cero).

Existen determinadas características específicas de las cepas que se encuentran asociadas con ciertos auxotipos, por ejemplo, cepas no productoras de penicilinas (no-NGPP) Arg⁻/Hyx⁻/Ura⁻ (AHU), son muy susceptibles a penicilina (Knapp y cols., 1984) y más resistentes a la acción bactericida del suero normal humano. Este tipo de cepas se aíslan significativamente más a menudo en pacientes con infección gonocócica diseminada o en casos asintomáticos (Knapp y Holmes, 1975).

Así mismo se han descrito variaciones geográficas y temporales en cuanto a la distribución de auxotipos (Bygdeman y cols., 1981); se han demostrado igualmente correlaciones entre determinados auxotipos y algunas serovariedades, y el perfil plásmidico (en las cepas productoras de penicilinas) (Dillon y cols., 1987), incluso se ha documentado la existencia de correlación entre ciertos auxotipos y el sexo o hábito sexual de los pacientes (Backman y cols., 1985).

La auxotipia debe emplearse siempre en combinación con otros marcadores, especialmente la serotipia, debido a que normalmente sólo se encuentra un número reducido de auxotipos en las cepas circulantes. La utilización de la auxotipia junto con la clasificación serológica, aumenta notablemente el poder discriminatorio de las cepas de gonococo.

TABLA III. AUXOTIPOS DESCRITOS EN *NEISSERIA GONORRHOEAE*

	PRO	ARG	MET	HIS	LYS	LEU	HYX	URA	V	V ⁺ THI	V ⁺ THPP	ARG ⁺ ORN	
1 Cero	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	nd
2 Pro	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	nd
3 Arg	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	+
4 Met	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	nd
5 Thi	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	nd
6 Thp	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	nd
7 Pro,Arg	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	+
8 Pro,Met	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	nd
9 Pro,Hyx	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	nd	nd	nd
10 Pro,Hyx Thi	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	nd
11 Pro,Arg Hyx,Ura	0	0	+	+	+	+	+	0	0	+	nd	nd	+
12 Arg,Met	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	+
13 Arg,Hyx	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	nd	nd	+
14 Arg,Hyx Ura	+	0	+	+	+	+	+	0	0	+	nd	nd	+
15 Arg,Met Hyx,Ura	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	nd	nd	+
16 Arg',Hyx Ura	+	0	+	+	+	+	+	0	0	+	nd	nd	0
17 Arg',Met Hyx,Ura	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	nd	nd	0
18 Arg',Hyx Ura,Thp	+	0	+	+	+	+	+	0	0	0	0	+	0
19 Arg,Hyx Ura,Thp	+	0	+	+	+	+	+	0	0	0	0	+	+
20 Arg,Hyx Ura,Thi	+	0	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+
21 Pro,Thp	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	nd
22 Pro,Met Thp	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	0	+	nd
23 Pro,Thi	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	nd
24 Arg,Thi	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+
25 Lys	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	nd	nd	nd
26 His	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	nd	nd	nd
27 Arg,His	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	nd	nd	+
28 Arg,His Hyx,Ura	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	nd	nd	+
29 Arg',His Hyx,Ura	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	nd	nd	0
30 Arg,Leu Hyx,Ura	+	0	+	+	+	0	0	0	0	+	nd	nd	+

continua en la página siguiente.....

TABLA III. Continuación

	PRO	ARG	MET	HIS	LYS	LEU	HYX	URA	V	THI ⁺	THPP ⁺	ORN ⁺
31 Arg',Leu Hyx,Ura	+	0	+	+	+	0	0	0	+	nd	nd	0
32 Arg',Leu Hyx,Ura,Thp	+	0	+	+	+	0	0	0	0	0	+	0
33 Pro,Arg' Met,Hyx,Ura	0	0	0	+	+	+	0	0	+	nd	nd	0
34 Pro,Arg' Met,Leu,Hyx Ura	0	0	0	+	+	0	0	0	+	nd	nd	0
35 Pro,Arg Hyx,Ura,Thp	0	0	+	+	+	+	0	0	0	0	+	+
36 Hyx	+	+	+	+	+	+	0	+	+	nd	nd	nd

Abreviaturas utilizadas:

Pro: Prolina; Arg: Arginina; Met: Metionina; Thi: Tiamina; Thp: Pirofosfato de Tiamina; Hyx: Hipoxantina; Ura: Uracilo; Lys: Lisina; His: Histidina; Leu: Leucina; Arg': Cepas que no crecen en ausencia de Arginina, pero que lo hacen en presencia de Ornitina; nd: no determinado; V: mezcla de vitaminas (Tiamina, colina, inositol, biotina, etc.); THPP: Pirofosfato de tiamina.

2.2.2 Serotipia

Sandström y Danielsson, en 1980, describieron las bases para la clasificación serológica de los gonococos utilizando un método de coaglutinación. Empleando anticuerpos antigonocócicos policlonales de conejo dividieron a los gonococos en tres grandes grupos denominados WI, WII y WIII, basándose en las diferencias antigénicas de la Proteína I (PI) de la membrana externa.

Sandström y cols., en 1982, utilizando el mapeado de péptidos definieron dos moléculas principales de la PI a las que denominaron A y B. Las cepas del serogrupo WI poseían antígenos de PI/A, mientras que las cepas de los serogrupos WII y WIII tenían antígenos de PI/B.

Tam y cols., en 1982, desarrollaron anticuerpos monoclonales frente a epítomos de PI/A y PI/B respectivamente. La mayoría de las cepas de los serogrupos WI y WII/III reaccionaban con más de uno de los monoclonales frente a PI/A y PI/B.

En la actualidad existen dos esquemas de clasificación serológica descritos en la Tabla IV; en el esquema 1 se utiliza un panel de 6 anticuerpos monoclonales frente a la proteína IA y otros 6 frente a la proteína IB (Knapp y cols., 1984; Bygdeman y cols., 1985). En el esquema 2 se emplea un panel de 5 anticuerpos monoclonales frente a la PIA y 9 frente a la PIB, lo cual permite caracterizar un total de 13 serovariedades entre la PIA y 51 entre las cepas PIB (Sandström y cols., 1985).

El modelo de reacción observado con una cepa en particular se denomina serovariedad.

TABLA IV. ESQUEMAS DE CARACTERIZACION SEROLOGICA DE LAS
CEPAS DE *NEISSERIA GONORRHOEAE*

ESQUEMA 1

SEROVARIIDADES		ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A LA PROTEINA IA					
		b	e	d	g	i	h
Abg ^a	13 ^b	x			x		
Abe	15	x	x				
Abed	14	x	x	x			
Abeg	7	x	x		x		
Abedg	5	x	x	x	x		
Abedh	11	x	x	x			x
Abedgh	9	x	x	x	x		x
Abedgi	12	x	x	x	x	x	
Abedgih	1	x	x	x	x	x	x
Aedgih	2		x	x	x	x	x
Aedih	6		x	x		x	x
Aedgh	10		x	x	x		x
Aedh	3		x	x			x
Aeg	16		x		x		
Aed	8		x	x			
Ae	4		x				
Ad	17			x			
Adgih	18			x	x	x	x

a, b: Nomenclatura empleada para denominar las serovariedades

continua en la página siguiente.....

TABLA IV. Continuación

ESQUEMA 1

SEROVARIIDADES		ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A LA PROTEINA IB					
		a	b	c	g	h	k
Ba	20	x					
Bak	6	x					x
Bahk	13	x				x	x
Bab	14	x	x				
Babk	3	x	x				x
Babhk	9	x	x			x	x
Bac	16	x		x			
Back	2	x		x			
Bachk	21	x		x		x	x
Babc	10	x	x	x			
Babck	1	x	x	x			x
Babcgk	26	x	x	x	x		x
Bb	17		x				
Bbk	23		x				x
Bbc	25		x	x			
Bbck	22		x	x			x
Bbgk	18		x		x		x
Bbghk	11		x		x	x	x
Bbhk	27		x			x	x
Bbcgk	5		x	x	x		x
Bck	19			x			x
Bcgk	7			x	x		x
Bchk	28			x		x	x
Bcghk	12			x	x	x	x
Bgk	8				x		x
Bghk	4				x	x	x
Bh	24					x	
Bhk	15					x	x

continua en la página siguiente.....

TABLA IV. Continuación

ESQUEMA 2

SEROVARIEDADES	ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTA A LA PROTEINA IA				
	r	o	s	t	v
Arost	x	x	x	x	
Aros	x	x	x		
Arot	x	x		x	
Aro	x	x			
Arst	x		x	x	
Ars	x		x		
Aost		x	x	x	
Aot		x		x	
Ao		x			
Ast			x	x	
As			x		
At				x	
Av					x

continua en la página siguiente.....

2.2.3 Plasmidotipia

Muchas cepas de *N. gonorrhoeae* poseen un plásmido conjugativo de 24.5 Megadaltons (Md), el cual puede transferir por conjugación, otros plásmidos no transferibles (Biswas y cols., 1980).

Un elevado número de gonococos poseen un plásmido (Pc') que codifica la producción de un tipo de β -lactamasa (penicilinas) llamada TEM-1. Estas cepas productoras de penicilinas se denominan NGPP. Se han descrito 5 plásmidos que codifican la producción de β -lactamasa: el plásmido de 3.2 Md "Africano", el de 3.05 Md "Toronto" y el de 2.9 Md "Rio" podrían haberse formado por deleciones del plásmido de 4.4 Md "Asiático". El plásmido de 4.0 Md "Nimes" parece provenir de la inserción de un fragmento en el plásmido de 3.2 Md. (Knapp y cols., 1990). Como puede observarse (Figura 1) presentan una estrecha relación entre sí; igualmente están muy relacionados con plásmidos similares encontrados en ciertas especies de *Haemophilus*, incluyendo *H. ducreyi* (Anderson y cols., 1984). De hecho hay autores que defienden la hipótesis de que los gonococos adquirieron el plásmido Pc' de *H. ducreyi* (Anderson y cols., 1984).

Los plásmidos Pc' son normalmente transferidos a otros gonococos por el plásmido conjugativo de 24.5 Md.

Los gonococos que poseen un plásmido de 25.2Md que codifica para resistencia a tetraciclina, transportan el plásmido conjugativo de 24.5 Md en el cual se ha insertado el transposon tetM (Morse y cols., 1986); sin embargo hay autores que discrepan, argumentando que la ruta evolutiva de ese plásmido de 25.2 Md haya sido por transposición del determinante tetM desde un organismo donante (probablemente un estreptococo) a un plásmido conjugativo de un huésped intermediario; o bien que el determinante tetM se haya asociado con el plásmido progenitor por recombinación en lugar de por transposición (Gascoyne y cols., 1990).

El determinante tetM también confiere resistencia a tetraciclina a otras bacterias, incluyendo algunas especies de *Streptococcus*, *Mycoplasma* y

varios microorganismos genitales, tales como *Gardnerella vaginalis* y *Ureaplasma urealyticum* (Roberts y cols., 1979).

Finalmente, la mayoría de los gonococos contienen un plásmido críptico de 2.6 Md, cuya función se desconoce por el momento.

El análisis del perfil plásmidico en *N. gonorrhoeae*, contribuye a caracterizar las cepas de gonococo, sobre todo en las NGPP (Fenoll y cols., 1987).

3. SENSIBILIDAD DE *NEISSERIA GONORRHOEAE* A LOS ANTIMICROBIANOS

La evolución de la resistencia a antimicrobianos en *N. gonorrhoeae* tiene implicaciones negativas en el control de la gonorrea.

Generalmente a los pocos años de utilizar en el tratamiento nuevos agentes antimicrobianos han aparecido cepas resistentes a los mismos. Cepas con resistencia múltiple cromosómica a penicilina, tetraciclina, eritromicina y cefoxitina, así como una disminución en la sensibilidad a ceftriaxona, se han descrito en todo el mundo. También se han detectado, esporádicamente, cepas con altos niveles de resistencia a espectinomicina. En la tabla V se describen los tipos de resistencia antimicrobiana en *N. gonorrhoeae*.

TABLA V. TIPOS DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN *N. GONORRHOEAE*

TIPO DE RESISTENCIA	AGENTE ANTIMICROBIANO
Cromosómica (genes localizados en el cromosoma)	Penicilina
	Tetraciclina
	Espectinomicina
	Cefoxitina
Mediada por plásmidos (genes localizados en plásmidos)	Ceftriaxona
	Penicilina (antibióticos β -lactámicos) NGPP
	Tetraciclina NGTR

3.1 Tratamientos antimicrobianos más utilizados frente a la gonorrea.

En la elección de un tratamiento antibiótico para infección gonocócica, además de la sensibilidad a los antimicrobianos, hay que tener en cuenta otros factores, como son , las características farmacocinéticas de los antibióticos, eficacia en gonorrea no complicada o en las que se producen complicaciones, eficacia diferencial en base a las diferentes localizaciones anatómicas que pueden estar afectadas, toxicidad y coste.

Un factor adicional en el tratamiento de la gonorrea y otras enfermedades de transmisión sexual, es la eficacia potencial del tratamiento en el caso de infecciones concurrentes.

Historicamente, la sífilis solía acompañar a las infecciones gonocócicas y todavía sigue jugando un papel importante en algunos países, sobre todo, en poblaciones marginales de países industrializados (por ejemplo en varones homosexualmente activos, drogadictos etc.) (Handsfield, 1990).

Sin embargo la infección más común entre personas heterosexuales, que coexiste actualmente con la gonorrea en Estados Unidos y Europa, es la infección por *Chlamydia trachomatis*. Estudios realizados en las dos últimas décadas confirman lo anteriormente dicho, ya que los resultados demuestran que entre un 15-25% de varones heterosexuales y un 35-50% de mujeres con gonorrea, estaban también infectadas con *C. trachomatis* (Batteiger y Jones, 1987). En estos pacientes existe un alto riesgo de que se produzca una uretritis post-gonocócica o enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), si el tratamiento no es eficaz frente a la infección por clamidias.

En España, sin embargo no se observa esta elevada incidencia en la infección por clamidias, situándose en un nivel muy bajo (Berrón y cols., 1988).

Hay que añadir que un elevado número de mujeres con infección gonocócica, presentan simultáneamente infección por *Trichomonas vaginalis*. En

Africa y otras áreas donde la prevalencia del chancroide es elevado, muchos pacientes pueden estar infectados por *Haemophilus ducreyi* en el momento de presentar infección gonocócica (Hook III y Handsfield, 1990).

La recomendación de la División de Enfermedades de Transmisión Sexual del Centro para el Control de Enfermedades (CDC), en cuanto al tratamiento a seguir, consiste en una dosis única con un antibiótico eficaz para erradicar a *N. gonorrhoeae*, seguida de 7 días de tratamiento con tetraciclina o eritromicina, para evitar posibles complicaciones por *C. trachomatis* (CDC, 1989).

En zonas donde la resistencia de *N. gonorrhoeae* a antimicrobianos no es un problema, una dosis única de 4.8 millones de unidades de penicilina procaína más 1 gramo de probenecid por vía intramuscular o una combinación de 2 gramos de ampicilina o bien 2 gramos de amoxicilina más 1 gramo de prebenecid por vía oral, da muy buenos resultados; seguido de los 7 días de tratamiento antibiótico frente a clamidias (CDC, 1987).

En aquellas zonas geográficas donde existe un índice elevado de cepas resistentes o bien no se realiza una vigilancia adecuada, el empleo de ceftriaxona (250 mg) o espectinomicina (2 gr) por vía intramuscular es el tratamiento adecuado.

El tratamiento con espectinomicina es muy eficaz en la infección gonocócica no complicada, genital y rectal, sin embargo se muestra sin efecto en infecciones faríngeas. El empleo de ceftriaxona, en cambio, da buenos resultados en los tres tipos de infección anteriormente citados.

En 1984, se describió la utilidad en el empleo de una nueva quinolona, norfloxacina, en el tratamiento de infección gonocócica (Crider y cols., 1984).

El entusiasmo que suscitó el tratamiento de la gonorrea con las primeras quinolonas (ácido nalidixico y rosoxacina), pronto desapareció debido a la rápida aparición de cepas resistentes y a los efectos neurotóxicos que se

producían (Dallabetta y Hook, 1989). Al mismo tiempo otras nuevas quinolonas (ciprofloxacina, ofloxacina, enoxacina, fleroxycina, etc.) han sido evaluadas en régimen de dosis única dando resultados prometedores.

Sin embargo, ya ha sido descrita la aparición de cepas resistentes a quinolonas aisladas en Filipinas (Joyce y cols, 1988), donde la rosoxacina ha sido ampliamente empleada durante varios años en el tratamiento de la gonorrea; así mismo en el año 1990, se produce el aislamiento de la primera cepa resistente a ciprofloxacina en el Reino Unido (Turner y cols., 1990), y posteriormente en 1991 se han descrito también cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a ciprofloxacina (Gransden y cols., 1991).

En la Tabla VI se describe el tratamiento recomendado a llevar a cabo en la infección gonocócica.

3.2 Sensibilidad frente a penicilina

En 1930, se llevó a cabo el primer tratamiento antibiótico frente a la gonorrea, siendo la sulfanilamida el antibiótico empleado. Sin embargo en 1944 ya se produjeron muchos aislamientos de cepas resistentes a ese antibiótico. Afortunadamente, en 1943 se publicaron por primera vez los resultados obtenidos en el tratamiento de la gonorrea con penicilina, con un porcentaje de éxito cercano al 100% (Mahoney y cols., 1943), siendo desde ese momento el tratamiento de elección.

Sin embargo a principios de 1950, empezaron a aparecer cepas resistentes a penicilina, aunque continuó siendo el tratamiento utilizado durante los siguientes 25 años ya que debido a su gran eficacia y baja toxicidad, permitió ir aumentando la dosis a fin de superar el incremento de la resistencia a penicilina.

En 1970, entre un 18-90% de los gonococos aislados en diferentes lugares del mundo habían desarrollado resistencia cromosómica a penicilina (Sparling, 1978).

TABLA VI. Tratamiento recomendado en infección gonocócica.

TERAPIA RECOMENDADA EN LA GONORREA NO COMPLICADA

Ceftriaxona:250 mg IM ^a	Doxiciclina:100 mg VO ^b /7días
○	○
Espectinomícina:2 gr IM +	Tetraciclina HCL:500 mg VO/7d
○	○
Ciprofloxacín:500 mg	Eritromicina base ^a :500 mg VO/7d

a: Vía intramuscular; b: Vía oral

* Se emplea en pacientes en los que el uso de tetraciclina está contraindicado (mujeres embarazadas y niños).

TERAPIA RECOMENDADA EN LA INFECCION GONOCOCICA COMPLICADA

SINDROME	TERAPIA RECOMENDADA
Infección gonocócica diseminada	Ceftriaxona:1gr IV/7 días
Meningitis/endocarditis	En general, se recomienda cefalosporinas de tercera generación
Ophthalmia Neonatal	Ceftriaxona:25-50 mg/kg/día IM ^a o IV/7 días
Adultos	Ceftriaxona:1gr IM o IV/1 dosis
EIP ^a gonocócica	Cefoxitin y probenecid + doxiciclina ○ Gentamicina o tobramicina + clindamicina

a: Vía intravenosa; b: Vía intramuscular

EIP: Enfermedad Inflamatoria Pélvica



En 1972, la dosis recomendada en el tratamiento de la gonorrea, fue incrementada de 2.4 a 4.8 millones de unidades de penicilina procaína, junto con la administración de 1 gr de probenecid que aumenta el efecto de la penicilina al retardar la excreción del antibiótico (CDC, 1972).

En 1976, se aislan por primera vez, cepas de gonococo con resistencia a penicilina mediada por plásmidos.

A partir de entonces, y hasta 1979, se produce un aumento gradual en la incidencia de cepas NGPP. La transmisión endémica de este tipo de cepas se incrementó gradualmente hasta 1985 y desde entonces la proporción de cepas NGPP ha aumentado dramáticamente.

3.2.1 Mecanismos de resistencia

Los gonococos presentan dos mecanismos de resistencia frente a penicilina:

- a. Resistencia mediada por plásmidos
- b. Resistencia cromosómica

a. Resistencia mediada por plásmidos

Como hemos dicho, la primera vez que se describen cepas de *N. gonorrhoeae* con un alto nivel de penicilina mediada por plásmidos fue en 1976 (Phillips, 1976). Estas cepas presentan un plásmido (Pc') que codifica la producción de un tipo de β -lactamasa llamada TEM-1 y fueron aisladas al mismo tiempo en el Oeste de Africa, Asia, Europa y Estados Unidos (Roberts y cols., 1977; Perine y cols., 1977).

Las cepas productoras de penicilinas (NGPP), aisladas en el Oeste de Africa contenían un plásmido, que codificaba para la producción de β -lactamasa, de 3.2 Md; mientras que el plásmido contenido en las cepas NGPP asiáticas era de 4.4 Md.

Recientemente se han descrito otros plásmidos que codifican la producción de β -lactamasa, sin embargo no tienen de momento una amplia distribución (Embden y cols., 1985; Gouby y cols., 1986; Yeung y cols., 1986; Brett, 1989).

Estos plásmidos Pc' normalmente se traspasan de unos gonococos a otros por conjugación a través del plásmido de transferencia de 24.5 Md.

El mecanismo de acción de la β -lactamasa, consiste en la hidrólisis del anillo β -lactámico de la penicilina, convirtiéndola en un derivado inactivo.

b. Resistencia cromosómica

Este tipo de resistencia es debido a la acumulación de diferentes mutaciones independientes en el cromosoma, las cuales afectan a la superficie celular.

Existen 3 loci implicados en la resistencia cromosómica a penicilina que son penA, penB y mtr (Cannon y Sparling, 1984).

La mutación en el locus penA tiene como resultado la alteración de la proteína fijadora de penicilina 2 (PBP 2), con lo que disminuye la afinidad de esta PBP 2 por la penicilina. Actualmente se conoce que la presencia de un aminoácido extra (residuo de ácido Aspártico) en la PBP2, el cual no está presente en la PBP2 de las cepas sensibles a penicilina, es la causa de esa baja afinidad (Brannigan y cols., 1990).

Las otras dos mutaciones en los loci penB y mtr, tienen como resultado la alteración de la membrana externa siendo menos permeable a la entrada de diversos componentes incluyendo la penicilina. Así mismo las mutaciones en estos loci incrementa la resistencia a antibióticos hidrofóbicos y tetraciclina respectivamente.

La aparición de este tipo de mutaciones en una cepa sensible tiene

como consecuencia un incremento en la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de penicilina desde 0.1 hasta 2-4 $\mu\text{g/ml}$.

3.2.2 Distribución geográfica de las cepas resistentes

En Estados Unidos el número de cepas NGPP se ha ido incrementando desde 1976, habiéndose declarado este tipo de cepas en todos los Estados. En 1988, en el sur de Florida y New York, la prevalencia de NGPP excedía el 33 y 10% respectivamente (CDC, 1987). A nivel nacional el número de aislados NGPP en 1989 era del 7,4% (CDC, 1990). Así mismo en 1987 el 13% de los aislados en los que no se detecta resistencia plasmídica a penicilina presentaban resistencia cromosómica a este antibiótico (CDC, 1987).

En Canadá, también hay un aumento drástico en la tasa de incidencia a partir de 1960, estabilizándose en 1976 y empieza a disminuir a partir de 1981.

En el Reino Unido la incidencia de las cepas NGPP, ha aumentado hasta 1983, disminuyendo posteriormente. Sin embargo el porcentaje de cepas con resistencia cromosómica a penicilina ha aumentado desde un 6% en 1985 hasta un 10,6% en 1988 (Ison y cols., 1990).

En Holanda la prevalencia de cepas no-NGPP entre 1983-1986 fue de un 14% (van Klingeren y cols., 1988), siendo hasta hace poco el país europeo con mas alta incidencia de cepas NGPP (van Klingeren y cols., 1985).

En los Países Nórdicos la incidencia de NGPP es bastante baja, encontrándose en torno al 1% con respecto al total de casos.

En un estudio realizado en Senegal la proporción de gonococos resistentes a penicilina, aumenta de 18 a 46%, en el periodo de 1982-1986 (Lind y cols., 1991).

En España, se ha producido también un incremento en la incidencia de cepas NGPP, como se pone de manifiesto en un trabajo presentado en la VII Reunión Nacional del Grupo Español para la Investigación de las Enfermedades de Transmisión sexual (Nogueira y cols., 1990). Desde 1983-1990 la incidencia de cepas resistentes a penicilina por mutación cromosómica, ha sido importante; en 1990 el número de cepas no-NGPP disminuye debido probablemente a una menor utilización de penicilina en el tratamiento de la infección gonocócica, aunque es necesario observar si esta baja frecuencia de aislados no-NGPP se mantiene.

3.3 Sensibilidad frente a Tetraciclina

3.3.1 Mecanismos de Resistencia

La resistencia a Tetraciclina también se ha incrementado en los últimos años y es debida, por un lado al efecto aditivo de varias mutaciones cromosómicas o bien a la adquisición de plásmidos.

Los loci cromosómicos que intervienen en este tipo de resistencia han sido designados penB, mtr y tet, dos de éstos, como ya hemos dicho, están involucrados también en la resistencia cromosómica a penicilina. El resultado es un incremento en la CMI a tetraciclina de 0.25 a 2-4 $\mu\text{g/ml}$ (Cannon y Sparling, 1984).

El mecanismo de resistencia a tetraciclina se basa en la producción de un aumento de permeabilidad de la membrana celular, que impediría por un mecanismo continuado de entrada y salida, alcanzar en el interior concentraciones útiles para ejercer su acción.

Un más alto nivel de resistencia a tetraciclina (CMI $\geq 16 \mu\text{g/ml}$), se encuentra en los gonococos que contienen un plásmido de 25.2 Md, que parece ser un derivado del plásmido conjugativo de 24.5 Md, como ya se mencionó previamente.

El plásmido Tc' contiene el determinante tetM en una posición en la que no se inactiva la función del plásmido conjugativo, con lo que los gonococos Tc' pueden transferir este plásmido, así como los plásmidos Pc', a otros gonococos. Incluso la transferencia de plásmidos entre gonococo y otras especies del género *Neisseria*, resulta ser más eficaz cuando es este plásmido el implicado (Roberts y Knapp, 1988).

El mecanismo de resistencia mediado por tetM, implica la producción de una proteína citoplásmica que protege a los ribosomas de la acción de la tetraciclina (Tartaglione y Russo, 1990).

3.3.2 Distribución geográfica de la resistencia a Tetraciclina

La primera vez que se describieron cepas de gonococo con alto nivel de resistencia a tetraciclina, mediada por plásmidos, fue en Estados Unidos en 1985. La prevalencia de cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a tetraciclina (NGRT), varía geográficamente; presentándose sin embargo una amplia distribución (CDC, 1987).

En Holanda el 10% de los gonococos aislados entre 1985-1986 presentaban resistencia cromosómica a tetraciclina (van Klíngeren y cols., 1988) y alrededor del 9% de las cepas NGPP y el 5% de las no-NGPP, en 1988, eran además NGRT con resistencia plasmídica (van Klíngeren y cols., 1989).

También se han descrito cepas de *N. gonorrhoeae* con resistencia plasmídica a tetraciclina en el Reino Unido (Waugh y cols., 1988) y en Francia (Casin y cols., 1989).

Los más altos niveles de resistencia plasmídica a tetraciclina han sido descritos en Estados Unidos, en concreto en el área de Baltimore, donde entre un 15-20% de los aislamientos llevados a cabo desde 1986 a 1988 fueron NGRT; así mismo el 48% de los gonococos aislados sin ningún tipo de resistencia plasmídica presentaban resistencia cromosómica a este antibiótico (CDC, 1987).

La tasa de cepas NGRT a nivel nacional en 1989 es de un 4.9% (CDC, 1990).

En Canadá, entre 1986 y 1987, las cepas NGRT representaban el 2% de los aislamientos realizados (Dillon y Carballo, 1989).

En España existe una elevada incidencia de cepas de *N.gonorrhoeae* resistentes a tetraciclina (Nogueira y cols., 1990). Aunque desde 1983-1990 el número de cepas con resistencia cromosómica ha ido disminuyendo, en 1990 el porcentaje de este tipo de aislados aún es del 19.1%. En 1990 se describe por primera vez en España una cepa de gonococo con resistencia plasmídica a tetraciclina (Vázquez y cols., 1990).

3.4 Sensibilidad frente a Espectinomicina

3.4.1 Mecanismos de Resistencia

Durante muchos años, han sido muy pocos los casos descritos de cepas resistentes a espectinomicina (Sp_c), pero en aquellas zonas geográficas donde este antibiótico se ha empleado muy frecuentemente a causa de la prevalencia de cepas Pc', los aislamientos de *N. gonorrhoeae* resistentes a espectinomicina (Sp_c') son más habituales (Boslego y cols., 1987).

La resistencia Sp_c' es debida normalmente a mutaciones cromosómicas que afectan a la subunidad ribosómica 30s.

3.4.2 Distribución geográfica de la resistencia a espectinomicina

En Corea, y debido a la alta tasa de cepas NGPP, se impuso como tratamiento antibiótico, a partir de 1981 la espectinomicina; en 1987, fue descrito un brote de gonorrea producido por gonococos con un alto nivel de resistencia a espectinomicina (Boslego y cols., 1987).

La investigación de dicho brote puso en evidencia el efecto que la presión selectiva antimicrobiana había producido en el desarrollo de la resistencia a este antibiótico.

En Estados Unidos, se han descrito casos esporádicos de gonococos resistentes a espectinomicina, no siendo muy habituales este tipo de cepas (Ison y cols., 1983).

En España no se han descrito cepas con resistencia cromosómica a espectinomicina (Vázquez, 1991).

3.5 Sensibilidad frente a cefalosporinas

3.5.1 Mecanismos de resistencia

El mecanismo de resistencia a cefalosporinas, es similar al descrito para penicilina, incluyendo mutación cromosómica y resistencia mediada por plásmidos. Los plásmidos pueden codificar la producción de enzimas que destruyen las cefalosporinas.

A diferencia de las NGPP, los gonococos resistentes a penicilina por mutación cromosómica presentan también una disminución en la sensibilidad a cefalosporinas (Whittington y Knapp., 1988).

Las mutaciones responsables de la resistencia cromosómica a penicilina (pen A, Pen B y mtr), producen así mismo una reducción en la sensibilidad a las cefalosporinas de segunda y tercera generación. Ha sido descrita la estrecha relación que existe entre la resistencia cromosómica a penicilina y la aparición de baja sensibilidad a cefuroxima en aislados clínicos no-NGPP (Ison y cols., 1990).

De momento no se han descrito en *N. gonorrhoeae* lactamasas que inactiven a las cefalosporinas.

3.5.2 Distribución geográfica de la resistencia a cefalosporinas

Por el momento no se han descrito casos de cepas cuya resistencia a ceftriaxona haya producido fallo terapéutico. Sin embargo, se han descrito fracasos terapéuticos por la aparición de cepas con resistencia cromosómica a cefalosporinas de segunda generación (Rice y cols., 1986); con lo cual y por lo dicho anteriormente, el uso en el tratamiento de la gonorrea de cefalosporinas de segunda y tercera generación, podría ejercer una presión selectiva produciéndose un incremento en la prevalencia de las cepas no-NGPP.

En España no se han aislado cepas de gonococo resistentes a cefalosporinas. Sin embargo si se han producido un abundante número de aislamientos con sensibilidad disminuida a cefoxitina (Vázquez, 1991).

3.6 Sensibilidad frente a quinolonas

3.6.1 Mecanismos de resistencia

El mecanismo de resistencia a las quinolonas consiste en la inhibición de la subunidad A de la enzima ADN girasa, esencial en la replicación del ADN.

3.6.2 Distribución geográfica de la resistencia a quinolonas

En 1984, se describió la utilidad del empleo de norfloxacina en el tratamiento de la infección gonocócica.

Sin embargo, como ya hemos dicho anteriormente, aparecieron rápidamente cepas resistentes, además de los efectos secundarios nocivos que su uso producía.

Se han realizado evaluaciones de tratamiento de la gonorrea

empleando las nuevas quinolonas (ciprofloxacina, ofloxacina, enoxacina, etc.), aunque los resultados obtenidos eran prometedores (Dallabetta y Hook, 1989), ya en 1990, se aísla la primera cepa resistente a ciprofloxacina en el Reino Unido (Turner y cols., 1990), y en 1991 también en el Reino Unido se describe el aislamiento de 23 cepas resistentes a ciprofloxacina (Gransden y cols., 1991).

..... OBJETIVOS

Neisseria gonorrhoeae es el agente etiológico de la gonorrea cuyas manifestaciones clínicas más frecuentes son uretritis, cervicitis, salpingitis, artritis, etc. Está estrechamente relacionado con *N. meningitidis* agente causal de la meningitis cerebroespinal epidémica, presentando así mismo una relación relativamente próxima con *N. lactamica* que se comporta como patógeno oportunista.

Las relaciones entre los miembros de la Familia *Neisseriaceae* han sido estudiadas llevando a cabo la aplicación de una serie de marcadores como la hibridación de ADN, composición de bases de ADN, comparación inmunológica de proteínas, perfiles bioquímicos y transformación entre las distintas especies que la componen. Aunque estos métodos han permitido una redefinición de la estructura taxonómica de esta Familia, permanecen aún muchas cuestiones por resolver.

N. gonorrhoeae es un microorganismo muy sensible a los antimicrobianos, cuando se compara con otras bacterias Gram negativas. Sin embargo, el tratamiento de la infección gonocócica en los últimos años se ha ido haciendo más complicado debido por un lado a la adquisición de diversos plásmidos en la especie que codifican para altos niveles de resistencia y por otro lado, por el aumento de cepas resistentes a penicilina por mutación cromosómica, en donde se encuentran implicados los loci pen A, pen B y mtr. Las mutaciones en los loci pen B y mtr producen una alteración de la membrana externa haciendo que sea menos permeable y evitando así la entrada de la penicilina, incrementándose así mismo la resistencia a antibióticos hidrofóbicos y tetraciclina respectivamente.

La aplicación de marcadores fenotípicos ha permitido a algunos autores establecer asociaciones entre determinados tipos de cepas y la resistencia a antimicrobianos. Así mismo, el análisis de los resultados que se obtienen al aplicar estos marcadores ha sido de gran utilidad en el estudio de brotes y en el conocimiento de las cepas circulantes.

Nuestro estudio pretende, por un lado, analizar la ubicación de la especie *N. gonorrhoeae* dentro del género *Neisseria*, realizando un estudio de

polimorfismo enzimático en las diferentes especies que componen dicho género y por otro lado, tratar de aportar datos acerca de la evolución filogenética que ha tenido lugar entre las especies.

A partir de 1983, en el laboratorio de E.T.S del Centro Nacional de Microbiología, se han aplicado diferentes marcadores epidemiológicos con el fin de caracterizar las cepas de gonococos recibidas de distintas Comunidades Autónomas.

La aplicación de un único marcador no discrimina más que un número reducido de cepas, por lo que el empleo conjunto de serotipia, auxotipia y plasmidotipia se hace necesario.

De esta forma empleando las técnicas de tipificación antes mencionadas, a lo largo de los 9 años analizados, podríamos obtener una perspectiva global del tipo de cepas de gonococo más frecuente en nuestro país, así como investigar la evolución de sensibilidad a antimicrobianos durante ese periodo de tiempo.

En los últimos años, se ha descrito la utilidad de la electroforesis de isoenzimas aplicada en cepas de diferentes especies bacterianas; de estos estudios se han obtenido conclusiones interesantes en cuanto a la estructura genética de poblaciones así como a la variación genética que han experimentado dichas poblaciones.

Los estudios que hemos realizado van encaminados a conseguir los siguientes objetivos:

1. Ubicación de la especie *N. gonorrhoeae* dentro del género *Neisseria*, así como analizar la evolución genética que han experimentado las diferentes especies que forman el género.

2. Estudiar la sensibilidad a antimicrobianos de las cepas de gonococo recibidas en nuestro laboratorio desde 1983 hasta 1991.

3. Determinar las posibles relaciones que puedan existir entre los marcadores fenotípicos (Auxotipia, Serovariedades y Plasmidotipia), que se utilizan en la caracterización de las cepas de gonococo.

4. Realizar un estudio de polimorfismo enzimático en cepas de gonococo productoras de β -lactamasa.

5. Analizar las relaciones genéticas entre cepas de gonococo no productoras de penicilinas, aplicando la electroforesis de isoenzimas.

6. Establecer el tipo de relación que se presenta al aplicar los marcadores fenotípicos y genotípicos en el grupo de cepas de gonococo no productoras de β -lactamasa.

7. Analizar si la resistencia a penicilina y/o tetraciclina se encuentra ligada a uno o a varios clones de la población de gonococos en nuestro país mediante la aplicación del análisis multienzimático.

..... MATERIAL Y METODOS

1. CEPAS DEL GENERO *NEISSERIA*

Las cepas utilizadas en este estudio las dividimos en dos grupos:

- a) Cepas de *N. gonorrhoeae*
- b) Cepas de otras especies del género *Neisseria*

1.1 Cepas de *Neisseria gonorrhoeae*

1.1.1 Procedencia de las cepas

Las cepas de gonococo que hemos empleado las podemos agrupar en cepas control o de referencia y cepas aisladas de enfermos con infección gonocócica.

a) Cepas control o de referencia

Estas cepas se han utilizado como controles en los diferentes ensayos realizados. En total se han empleado 19 cepas, agrupadas de la siguiente forma:

- Cepas patrón de auxotipia

CEPA	AUXOTIPO	PROCEDENCIA
<i>N. gonorrhoeae</i>		
ODH2915	Prototrófico	NCTC* 10928
MHD340	-Thi	NCTC 10929
MHD361	-Pro -Hyx	NCTC 10930
SS7764/45	-Pro -Met -Thpp	NCTC 10931
MCH3317/70	-Arg -Met	NCTC 10932
MHD446	-Arg -Hyx -Ura	NCTC 10933

* National Culture Type Collection

- Cepas patrón de Plásmidos

CEPA	PATRON DE PLASMIDOS	PROCEDENCIA
<i>N. gonorrhoeae</i>		
6016	24.5Md + 4.5Md + 2.6Md	Dr Knut*
6395	24.5Md + 4.5Md + 2.6Md	Dr Knut
5449	3.2Md + 2.6Md	Dr Knut

* Dr Knut Lincoln, University de Göteborg, Suecia

- Cepas patrón de serotipia

CEPA	SEROGRUPO	PROCEDENCIA
<i>N. gonorrhoeae</i>		
13573	IA (WI)	Dr Knut
13576	IA (WI)	Dr Knut
13572	IB (WII)	Dr Knut
13583	IB (WII)	Dr Knut
13577	IB (WIII)	Dr Knut

- Cepas patrón de antibiograma

CEPA	ANTIBIOTIPO					PROCEDENCIA
	Pen	Esp	Tetra	Cefox	Ceftr*	
<i>N. gonorrhoeae</i>						
WHO - A	S	R	S	S	S ^b	Dr Knut
WHO - B	S	S	S	S	S	Dr Knut
WHO - C	S	S	MR	S	S	Dr Knut
WHO - D	MR	S	R	MR	S	Dr Knut
WHO - E	R	S	MR	S	S	Dr Knut

a) Pen (Penicilina), Esp (Espectinomicina), Tetra (Tetraciclina), Cefox (Cefoxitina), Ceftr (Ceftriaxona)

b) Cepas aisladas de enfermos

En total se han estudiado 360 cepas de gonococo aisladas de enfermos con infección gonocócica enviadas a nuestro laboratorio para referencia desde 1983 hasta 1991; se han incluido 40 cepas por año en el período de tiempo señalado, de las cuales 20 eran cepas sensibles a penicilina y las otras 20 presentaban resistencia cromosómica a dicho antibiótico.

1.1.2 Transporte, crecimiento y conservación de las cepas

Las cepas recibidas en nuestro laboratorio para referencia fueron enviadas por diversos laboratorios microbiológicos de diferentes Comunidades Autónomas.

En el laboratorio de origen, las cepas se sembraron en un agar chocolate en placa o en tubo de tapón de rosca, se incubaron 18-24 horas a 35-37° C con un 5% de CO₂, y se enviaron entonces por correo.

Cuando las cepas llegaban a nuestro laboratorio, se realizaba inmediatamente un pase a una placa de medio GC que consiste en un agar base GC (Difco) en una proporción de 36 gr/l., más un suplemento de enriquecimiento al 1% que consiste en:

- Glucosa (Sigma)..... 40 gr
- L-Glutamina (Sigma)..... 1 gr
- Fe(NO₃)₃.9 H₂O (Sigma)..... 50 mgr
- Solución THPP..... 0.44 ml
- H₂O destilada hasta.....100 ml

La solución THPP se realizó con los siguientes componentes:

- Pirofosfato de Tiamina-Cl (Sigma).....115 mg
- H₂O destilada..... 25 ml

Este suplemento puede filtrarse y distribuirse en viales a razón de 5 ml y mantenerse congelado a -15° C hasta 4 meses.

Después de realizar el pase, las placas de GC eran incubadas 24-48 horas a 37° C con 5% de CO₂, junto con el tubo o la placa en que se había realizado el transporte. Si el crecimiento en la placa de GC es un cultivo puro de gonococo, se realizan las pruebas de confirmación que veremos más adelante y se conservan a -70° C en una solución de 7 partes de caldo de triptona y soja (Difco) y 3 de glicerol (Merck) en un congelador de nieve carbónica. En caso de que el cultivo se encuentre contaminado con otros microorganismos se realiza un nuevo pase, bien de la placa de GC o bien del tubo o placa en que fue transportado, a una placa de medio selectivo (Thayer-Martin). Una vez que se ha producido el aislamiento de la cepa se procede como hemos dicho anteriormente.

1.2 Otras cepas del género *Neisseria*

Al igual que en el apartado 1.1, las cepas utilizadas en este estudio las agrupamos en cepas patrón y cepas aisladas de enfermos y/o portadores.

1.2.1 Procedencia de las cepas

a) Cepas patrón

Las cepas patrón que hemos empleado pertenecían a diferentes especies del género *Neisseria*, en total han sido 15 cepas, que se describen a continuación:

CEPA

PROCEDENCIA

<i>N. polysaccharea</i>	
N462	Dr Riou
<i>N. lactamica</i>	
10616	ATCC ^{a)}
<i>N. lactamica</i>	
10617	ATCC
<i>N. denitrificans</i>	
14686	ATCC
<i>N. flava</i>	
1263	Dr Albert
<i>N. flava</i>	
14221	ATCC
<i>N. subflava</i>	
19243	ATCC
<i>N. perflava</i>	
10555	ATCC
<i>N. sicca</i>	
29193	ATCC
<i>N. sicca</i>	
9913	ATCC
<i>N. flavescens</i>	
13120	ATCC
<i>N. cinerea</i>	
14685	ATCC
<i>N. elongata</i>	
25295	ATCC
<i>N. macacca</i>	
33926	ATCC
<i>N. canis</i>	
14687	ATCC
<i>N. cuniculi</i>	
14688	ATCC

a) ATCC: American Type Culture Collection

Dr Riou, Instituto Pasteur, Paris, Francia

Dr Albert, Centre Collaborateur O.M.S., Marsella, Francia

b) Cepas aisladas de enfermos y/o portadores**Cepas de *N. polysaccharea***

Se han estudiado 19 cepas de *N. polysaccharea*, aisladas de nasofarínge de portadores, en encuestas realizadas en nuestro laboratorio de diferentes Comunidades Autónomas y en diferentes años.

Cepas de *N. lactamica*

En el estudio hemos incluido 17 cepas de *N. lactamica*, de las cuales 16 fueron aisladas de nasofarínge de portadores y 1 cepa aislada de exudado vaginal.

Cepas de *N. mucosa*

Se han incluido seis cepas de *N. mucosa*, de las que 4 han sido aisladas de sangre de enfermos, y 2 de nasofarínge de portadores.

Cepas de *N. cinerea*

En el estudio hemos empleado 6 cepas de *N. cinerea*, aisladas de diferentes localizaciones como son: nasofarínge, absceso tirogloso, cuello uterino y placenta.

Cepas de *N. perflava/sicca*

Se han incluido 16 cepas de *N. perflava/sicca* de las cuales 14 se han aislado de nasofarínge de portadores y 2 de líquido cefalorraquídeo de enfermos.

Cepas de *N. meningitidis*

Se han incluido 20 cepas de *N. meningitidis* con las siguientes características:

N° CEPA	Localización	Serogrupo	Serotipo/Subtipo
7318	ENF ^a	Z	5, 12
8007	Sangre	C	2b
7558	Espujo	X	12
7813	Sangre	Y	NT ^b
7584	ENF	Z	5
7937	LCR ^c	A	15:P1.10
8010	LCR	C	2a
8018	LCR	B	4:P1.15
8030	LCR	B	4:P1.15
8028	LCR	B	4:P1.9
8031	Sangre	B	4:P1.1,7
8036	Sangre	C	2b
8035	ENF	29E	NT P1.16
8264	ENF	C	2a
8266	Sangre	C	2b
8271	-	C	NT
8251	LCR	C	2b:P1.1,2
8255	ENF	B	4:P1.15
8272	ENF	C	NT
8263	ENF	B	4:P1.15

- a) ENF: Exudado nasofaríngeo
 b) NT: No Tipable
 c) LCR: Líquido cefalorraquídeo

1.2.2 Transporte, crecimiento y conservación de las cepas

Las cepas fueron enviadas a nuestro laboratorio de diferentes laboratorios de diversas Comunidades Autónomas. El medio de transporte fue agar sangre en placas o bien un medio de transporte consistente en una parte de caldo Eugon (Difco) y tres partes de huevo coagulado. Este medio permite una mayor viabilidad de las cepas y fue suministrado por nuestro laboratorio en tubos con tapón de rosca a los laboratorios que lo solicitaron.

Todas las cepas recibidas, se sembraron en placas de agar Muller-Hinton con sangre de carnero al 5%, y en placas de este mismo medio a las que se añadía una mezcla inhibitoria (CNV) que está formada por: Colistina (750 $\mu\text{g/ml}$), Nistatina (1250 U/ml) y Vancomicina (3 $\mu\text{g/ml}$), con lo que se consigue un medio selectivo para neiserias patógenas, *N. lactamica* y *N. polysaccharea*. Los ingredientes por medio fueron:

Agar Muller-Hinton.....	19 ml
Sangre de carnero.....	1 ml
CNV.....	0.2 ml

Todas las cepas después de sembrarlas en los medios descritos, eran incubadas 24 horas a 37° C en atmósfera de CO₂ al 5% y fueron conservadas a -70° C en leche descremada (Difco) y/o liofilizadas en ese mismo medio.

2. PRUEBAS DE IDENTIFICACION Y CONFIRMACION

2.1 Prueba citocromo-oxidasa

Todas las especies del género *Neisseria* presentan actividad de oxidasa.

El procedimiento llevado a cabo para detectar dicha actividad (Morello y Bohnhoff, 1980), consiste en la impregnación de una tira de papel de filtro con una solución al 1% de hidrocloreuro de tetrametil-parafenilendiamina (Difco), a continuación se realiza la extensión de una colonia de una placa incubada 24 horas en la tira de papel, apareciendo en pocos segundos un ennegrecimiento en caso de que la prueba sea positiva.

El reactivo deberá prepararse a diario a partir de una solución stock producida con anterioridad.

Solución stock

Tetrametil-parafenilendiamina (Difco).....	1 gr
H ₂ O destilada.....	4 ml
Etanol (Merck).....	96 ml

Esta solución debe almacenarse en oscuridad.

Solución de uso

Se mezcla una parte de la solución stock con dos partes de agua destilada.

2.2 Prueba de la catalasa

A excepción de *N. elongata*, el resto de las neiserias tienen actividad de catalasa.

El método consiste en la colocación en un portaobjetos de una gota de H_2O_2 al 3 %; a continuación con un asa de platino, se toma una colonia de una placa incubada no más de 24 horas y se pone en la gota. Si la reacción es positiva se producen burbujas en unos pocos segundos.

2.3 Prueba de superoxol

Consiste en la detección de la actividad de catalasa de las cepas, pero utilizando H_2O_2 al 30%.

Los gonococos producen una reacción típica que permite diferenciarlos del resto de las neiserias. El procedimiento es el mismo que se realiza en la prueba de la catalasa; si la colonia a estudiar es de gonococo, se produce gran profusión de burbujas de una forma instantánea, produciéndose la misma reacción en el resto de las neiserias pero al cabo de unos pocos segundos.

2.4 Utilización de azúcares

El medio utilizado fue el Agar Cisteína-Triptosa (CTA) (Difco), al que se añaden los azúcares glucosa, maltosa, sacarosa, fructosa o lactosa. Se disuelven 29.5 gr del medio comercial en 1 litro de agua destilada y se añade el azúcar correspondiente al 1%, esterilizándose luego en autoclave a 1 atmósfera durante 15 minutos (Morello y Bohnhoff, 1980).

El medio se distribuye en tubos a razón de 3 ml. Estos, se inoculan con un cultivo de no más de 24 horas. El inóculo se realiza en el tercio superior del medio, incubándose posteriormente a 37° C en ausencia de CO_2 y en cámara húmeda, durante un máximo de 5 días, realizando lecturas todos los días.

Una reacción positiva viene dada por el cambio del indicador de pH (rojo fenol), que lleva incorporado el CTA, de rojo a amarillo, alrededor de la zona donde se realizó la inoculación.

Los distintos patrones que se obtienen en cuanto a la utilización de azúcares por las distintas neiserias estan reflejados en la Tabla I.

2.5 Detección de β -galactosidasa

De todas las especies de *Neisseria*, sólo en *N. lactamica* se detecta la presencia de este enzima.

Se utiliza una solución 5 mM de Orto-nitrofenilgalactopiranosido (ONPG) (Sigma) en tampón fosfato pH 6.9, cuya composición es la siguiente:

PO ₄ HNa ₂ (Merck) 0.15 M.....	66.6 ml
PO ₄ H ₂ K (Merck) 0.15 M.....	33.3 ml
H ₂ O destilada.....	900 ml

A partir de una placa incubada no más de 24 horas se realiza una suspensión densa del microorganismo en 0.5 ml del reactivo, que originalmente es incoloro; si vira a amarillo, la reacción se considera positiva. Normalmente el cambio de color se produce en pocos minutos, sin embargo a causa de reacciones más lentas debe hacerse la lectura a los 30 minutos.

2.6 Detección de γ -glutamil-aminopeptidasa

Esta prueba se realiza según el método de Hoke y Vedros, 1982.

A partir de un cultivo de 24 horas en agar sangre, se prepara una suspensión en buffer fosfato salino (PBS) pH 6.9, cuya preparación se ha descrito anteriormente. El sustrato N-glutamil- β -naftilamida, se solubiliza en NaOH 1N y se diluye hasta una concentración final de 0.004M en hidrocloreuro de hidroximetil-aminometano, obteniéndose un pH de 7.6. Se mezclan 40 μ l de la suspensión de la cepa con 40 μ l del sustrato, incubándose una hora en baño a 37° C. A continuación se añaden 25 μ l de reactivo A (tampón 2M tris (hidroximetil)

hidrocloruro de aminometano, que contiene una solución 0.35M de sodio dodecil sulfato), seguido de 25 μ l de reactivo B (solución de 3 gr de "fast blue BB" por litro de metoxietanol).

La lectura se realiza a los 15 minutos, siendo positivas las soluciones que se colorean de amarillo en ese tiempo.

2.7 Producción de polisacárido de sacarosa

Se preparan placas de agar TSA (Difco) con 5% de sacarosa. Las cepas a estudiar se siembran en estas placas y se incuban 24 horas a 37° C en 5% de CO₂; posteriormente se añaden unas gotas de lugol sobre el crecimiento. Cuando hay producción de polisacárido las colonias se ennegrecen.

2.8 Coaglutinación

El método de coaglutinación fue descrito por Danielsson y Kronvall en 1974, para la identificación serológica de *N. gonorrhoeae*. Básicamente consiste en unir anticuerpos de la clase IgG antigonocócicos con una cepa de *Staphilococcus aureus*, rica en proteína A, que se une al fragmento Fc de la inmunoglobulina dejando libre el fragmento Fab. Cuando el antisuero ligado al estafilococo se mezcla con una suspensión de gonococos, aparece una aglutinación visible gracias al entramado formado por los estafilococos.

Se ha desarrollado un juego de anticuerpos monoclonales frente a la proteína I de gonococo (Phadebact Monoclonal Gc test; Pharmacia) que permite realizar la confirmación de las cepas de gonococo y a la vez el serotipado.

Se realiza una suspensión de un cultivo de no más de 24 horas en un vial que contiene 0.5 ml de tampón fosfato (PBS) pH 6.9. El vial se introduce en un baño de ebullición durante 5 minutos con el fin de evitar problemas de autoaglutinabilidad y posteriormente se agita en un Mixer (Lab Line) durante 20-30

segundos.

El juego de antisueros comerciales se presenta con dos viales, uno con anticuerpos monoclonales frente a la proteína IA y otro frente a la proteína IB, así mismo se proporcionan unas cartulinas provistas de pocillos. Una gota de cada uno de los dos viales se coloca en dos pocillos separados, a continuación en cada pocillo se añade una gota de la suspensión de gonococo, y la cartulina se agita suavemente hasta un máximo de 4 minutos. Una aglutinación en cualquiera de los dos pocillos se considera positiva para *N. gonorrhoeae*. Normalmente la aglutinación es visible dentro del primer minuto de agitación de la cartulina.

3. SEROTIPADO DE LAS CEPAS DE *NEISSERIA GONORRHOEAE*

3.1 Serotipia frente a la proteína I

La serotipia frente a la proteína I se realiza con los mismos reactivos que se emplean en la coaglutinación para confirmación de las cepas (apartado 2.8). Este método permite diferenciar dos serotipos denominados IA (WI) y IB (WII/WIII).

3.2 Serovariedades

La determinación de serovariedades se efectúa con anticuerpos monoclonales frente a epítomos diferentes de la proteína I, suministrados por la Dra S. Bygdeman (Departamento de Microbiología Clínica, Hudding University Hospital, Estocolmo, Suecia) gracias a la colaboración de Pharmacia-Diagnostic.

Los anticuerpos monoclonales fueron suministrados ligados a estafilococo para realizar coaglutinación. Como ya se ha descrito en el apartado 2.2.2, el esquema de serovariedades determina 13 frente a IA y 51 frente a IB.

Como control se utilizan diluciones de antígenos de serovariedades conocidas, también suministradas por la Dra Bygdeman.

ANTIGENO	SEROVARIEDAD
978	Av
2291	Arst
5277	Arost
4412	Brpyust
11360	Bopyst
NK105	Bpyvut

El método que se sigue es el mismo que el descrito en el apartado 2.8.

En un porta-objetos se mezclan 25 μ l de la solución de la cepa con 25 μ l de cada serovariedad, se agita durante 3-4 minutos, al cabo de los cuales se procede a la lectura.

4. AUXOTIPADO DE LAS CEPAS DE *NEISSERIA GONORRHOEAE*

4.1 Medio completo, químicamente definido

La composición del medio utilizado para la auxotipia es muy compleja, y puede verse en la Tabla VII. Se parte fundamentalmente de una serie de soluciones, muchas de las cuales son almacenadas a 4° C hasta su uso, realizadas a partir de compuestos químicos que deben ser de un alto grado de pureza para obtener posteriormente unos resultados fiables.

4.1.1 Preparación de las soluciones

La preparación de cada solución así como su composición se describe a continuación:

- Solución 1

Se realiza en dos etapas. Primero se hace una solución con:

Acido L-glutámico (Sigma).....	13 gr
Acido L-Aspártico (Sigma).....	5 gr
Tetra-acetato disódico de etilendiamina (EDTA) (Sigma).....	37 mg
H ₂ O destilada.....	900 ml

Esta solución se calienta a 50° C en un baño con agua. Los componentes de la solución se van disolviendo lentamente mientras se va añadiendo NaOH hasta obtener un pH final de 7.2. Una vez disueltos los componentes citados anteriormente se añaden:

ClNa (Sigma).....	58 gr
SO ₄ K ₂ (Sigma).....	10 gr
Cl ₂ Mg.6H ₂ O (Sigma).....	4.1 gr
ClH ₄ N (Sigma).....	2.2 gr
H ₂ O hasta completar.....	1000 ml

Esta solución, una vez realizada, se esteriliza en autoclave a 121° C durante 20 minutos, y se almacena a 4° C hasta su uso por un máximo de 4 meses.

- Solución 2a

El contenido en 100 ml de agua es:

L-Arginina (Sigma)..... 1.5 gr

Glicina (Sigma).....250 mg

L-serina (Sigma)..... 0.5 gr

Esta solución se esteriliza por filtración con membranas estériles de nitrocelulosa de 0.22 micras de poro (Millipore), y se almacena a 4° C hasta su uso.

- Solución 2b

El contenido en 100 ml de agua es:

L-leucina (Sigma)..... 0.9 gr

L-isoleucina (Sigma).....300 mg

L-valina (Sigma)..... 0.6 gr

Se esteriliza y almacena de la misma forma que la anterior.

- Solución 3

Esta solución se realiza en dos pasos. En primer lugar se prepara una dilución:

Lactato sódico (Sigma)..... 10 gr

Glicerol (Sigma)..... 36.8 gr

Alcohol polivinílico (Sigma).....200 gr

H₂O destilada..... 150 ml

Esta solución se disuelve calentándola en un baño a 100° C durante 30 minutos. Una vez disuelta, y en caliente, se añade NaOH hasta alcanzar un pH de 7.3 y agua hasta un volúmen final de 195 ml. Se esteriliza a 121° C durante 15 minutos y se añaden 5 ml de una solución estéril al 20% (v/v) de Tween 80

(Sigma). Se conserva a 4° C hasta su uso.

- Solución 4a

Uracilo (Sigma)..... 200 mg
 NaOH 5N (Merck)..... 2 ml
 H₂O destilada..... 98 ml

Una vez realizada, esta solución se esteriliza por filtración y se almacena a 4° C hasta su uso.

- Solución 4b

Hipoxantina (Sigma).....80 mg
 ClH 1N..... 10 ml
 H₂O destilada..... 90 ml

Una vez realizada, se esteriliza y se almacena igual que la anterior.

- Solución 5

PO₄HK₂ (Merck).....34.8 gr
 PO₄H₂K (Merck).....27.2 gr
 H₂O destilada..... 2 l

Se esteriliza y se almacena de la misma forma que la anterior.

- Solución 6

Esta solución se realiza en varias etapas. En primer lugar se disuelven 100 mg de hemina (Sigma) en 4 ml de 2,2',2"-nitrilotrietanol (Sigma). Por otro lado, se hace una solución con 100 mg de L-histidina en 96 ml de H₂O destilada. A continuación se mezclan estas dos soluciones, y la solución final se reparte en viales a razón de 0.1 ml por vial. Se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos y se almacena hasta su uso a -20° C.

- Solución 7

Nicotinamida adenina dinucleótido (Sigma).500 mg

Hidrocloreuro de tiamina (Sigma).....	250 mg
Pantotenato cálcico (Sigma).....	500 mg
H ₂ O destilada.....	50 ml

La solución se esteriliza por filtración y se reparte en viales a razón de 0.5 ml por vial. Se almacena a -20° C hasta su uso.

- Solución 8

L-triptófano (Sigma).....	1.6 gr
L-treonina (Sigma).....	1 gr
L-alanina (Sigma).....	2 gr
L-lisina.ClH (Sigma).....	1 gr
L-prolina (Sigma).....	1 gr
H ₂ O destilada.....	200 ml

Una vez preparada se esteriliza por filtración y se guarda a 4° C hasta su uso.

-Solución 9

L-fenilalanina (Sigma).....	1 gr
L-asparagina (Sigma).....	1 gr
H ₂ O destilada.....	200 ml

Una vez hecha, los componentes se disuelven en un baño a 50° C, a continuación se esteriliza por filtración y se almacena a 4° C hasta su uso.

- Solución 10

Colina (Sigma).....	349 mg
Mio-inositol (Sigma).....	90 mg
H ₂ O destilada.....	50 ml

- Solución de L-glutamina

1 gr de L-glutamina en 100 ml de H₂O destilada.

- Solución de L-histidina

776 mg de L-histidina en 100 ml de H₂O destilada.

- Solución de L-metionina

1.49 gr de L-metionina en 100 ml de H₂O destilada.

- Solución de espermina

1.74 gr de tetrahidrocloreuro de espermina en 100 ml de H₂O destilada.

- Solución de bicarbonato sódico

8.4 gr de CO₃HNa (Merck) en 100 ml de H₂O destilada.

- Solución de dextrosa

20 gr de glucosa (Merck) en 100 ml de H₂O destilada.

- Solución de acetato sódico

34 gr de acetato sódico (Sigma) en 100 ml de H₂O destilada.

- Solución de tiamina pirofosfato (TIP)

115 mg de tiamina pirofosfato (Sigma) en 25 ml de H₂O destilada.

- Solución de Cl₂Ca.2H₂O

3.68 gr de Cl₂Ca.2H₂O (Merck) en 100 ml de H₂O destilada.

- Solución de (NO₃)₃Fe.9H₂O

101 mg de nitrato férrico (Sigma) en 25 ml de H₂O destilada.

- Solución de biotina

Se hace una solución saturada de biotina en una solución al 50% (v/v) de etanol ligeramente acidificada con ClH (pH 3-5). Esta solución no se esteriliza y se almacena a 4° C hasta su uso.

Las siguientes soluciones se hacen el mismo día en que se vaya a preparar el medio:

- Solución de L-tirosina

181.2 mg de L-tirosina (Sigma) en 5 ml de ClH 1N y posteriormente en 15 ml de H₂O destilada.

- Solución de L-cisteína

350.2 mg de L-cisteína (Sigma) en 4 mg de ClH 1N y posteriormente en 16 ml de H₂O destilada.

- Solución de L-cistina

240.3 mg de L-cistina (Sigma) en 5 ml de ClH 1N y posteriormente en 15 ml de H₂O destilada.

- Solución de ácido oxalacético

200 mg de ácido cis-oxalacético (Sigma) en 100 ml de H₂O destilada.

TABLA VII. COMPOSICION DEL MEDIO COMPLETO (NEDA)

	ml para 1l de medio
Solución 1.....	100
Solución 2a.....	10
Solución 2b.....	10
Solución 3.....	5
Solución 4a.....	4
Solución 4b.....	4
Solución 5.....	200
Solución de L-tirosina.....	6
Solución de L-cisteína-ClH.....	3.5
Solución de L-cistina.....	3
Solución de Acido cis-oxalacético..	100
Solución de NaOH 5N.....	hasta un pH de 7.1
Solución 8.....	10
Solución 9.....	5
Solución de L-glutamina.....	5
Solución de L-histidina.....	2
Solución de L-metionina.....	1
Solución de espermina.....	5
Solución de bicarbonato sódico.....	0.5
Solución de dextrosa.....	25
Solución de acetato sódico.....	10
Solución 6.....	2
Solución 7.....	0.2
Solución 10.....	0.2
Solución de biotina.....	1
Solución de pirofosfato de tiamina-ClH.	0.1
Solución de NaOH 1N.....	hasta un pH de 7.4
Agar purificado.....	500
Solución de $Cl_2Ca \cdot 2H_2O$	1
Solución de $(NO_3)_3Fe \cdot 9H_2O$	1

El orden de las soluciones es el mismo que se emplea al preparar el medio.

4.1.2 Preparación del agar

El agar que empleamos es de grado purificado (Difco). No obstante se ha descrito que puede contener diversos factores de crecimiento que pueden interferir en los resultados que se obtienen con la auxotipia (Catlin, 1973). Por esta razón, para eliminar contaminantes solubles en agua el agar se lava suspendiendo 25 gr en 500 ml de agua destilada. A continuación se recoge por centrifugación a 3000 rpm, desechando el sobrenadante. Este lavado se realiza dos veces y a continuación se vuelve a lavar suspendiendo el agar en etanol (95%) (Merck) y se recoge por centrifugación. Este lavado con etanol se realiza dos veces. Finalmente el agar fue puesto a secar en estufa de 37° C 48-72 horas.

4.2 Medios defectivos

Estos medios difieren del medio completo NEDA, ya visto en el apartado anterior, ya que se suprimen y/o se añaden diversos componentes. La composición del juego de los 13 medios defectivos utilizados en la auxotipia puede verse en la Tabla VIII.

Las diferentes soluciones en las que hay que eliminar algún componente se preparan de la misma forma que las soluciones completas, y se añaden al medio en el momento de su preparación. Las 3 soluciones que aparecen en la Tabla VIII que no aparecen en el medio completo, se esterilizan por filtración y se guardan a 4° C hasta su uso.

4.3 Inoculación, lectura e interpretación de los resultados

A partir de cultivos en GC de no más de 24 horas, se realizan

suspensiones en PBS (pH 6.9). La inoculación en los diferentes medios de auxotipia se realiza con ayuda de un multirreplicador, excepto en el caso del medio -V; la inoculación de varias cepas juntas en una misma placa de este medio puede dar como resultado la aparición de falsos positivos debido a sintrofismo entre las cepas (Catlin, 1977). Por esta razón, las cepas se inocularon cada una en una placa en este tipo de medio, con ayuda de un asa de platino. Los medios -V + Ti y -V + Tip sólo fueron inoculados con cepas que previamente no crecieron en el medio -V; el medio -Arg + Orn sólo fue inoculado con cepas que previamente no crecieron en el medio -Arg.

Las placas de auxotipia ya inoculadas se incuban a 37° C con 5% de CO₂ durante 48 horas, antes de realizar la lectura de las mismas.

Aquellas cepas que no crecen en el medio NEDA, se prueban una vez más; en caso de que nuevamente no se produzca crecimiento en ese medio, se consideran como no auxotipables. La lectura del resto de las placas de auxotipia se realiza asignando a cada cepa un auxotipo determinado, en función de la presencia o ausencia de crecimiento, según el esquema presentado en la Tabla III.

En cada lote de placas de auxotipia se inoculan cepas de referencia de auxotipo conocido para asegurar una correcta interpretación de los resultados.

TABLA VIII. COMPOSICION DE LOS MEDIOS DEFECTIVOS

Nombre	Componente eliminado	Componente añadido
-Cis	Sol. L-cisteína Sol. L-Cistina	Ninguno
-Pro	L-prolina	Ninguno
-Arg	L-arginina	Ninguno
-Met	Sol.L-metionina	Ninguno
-His	Sol. L-histidina	Ninguno
-Lis	L-lisina	Ninguno
-Leu	L-leucina	Ninguno
-Hix	Sol. 4b	Ninguno
-Ura	Sol. 4a	Ninguno
-V	Sol. 6, 7 y 10 biotina y tiamina	Ninguno
-V+Ti	Sol. 6, 7, y 10 biotina y tiamina	Sol. de tiamina- ClH (0.006mM)
-V+Tip	Sol. 6, 7 y 10 biotina y tiamina	Sol. de pirofos- fato de tiamina- ClH (0.001mM)
-Arg+Orn	L-arginina-ClH	Sol. de L-orn- ClH (0.7mM)

5. ANALISIS DE PLASMIDOS DE *NEISSERIA GONORRHOEAE*

5.1 Extracción de los plásmidos

Solamente se ha realizado en las cepas de gonococo productoras de β -lactamasa.

La cepa se inocula en una placa de agar GC con penicilina en una concentración de 1 mg/l. Tras la incubación a 37° C con un 5% de CO₂ durante 18-24 horas, con ayuda de un asa de platino la cepa se resuspende en 50 μ l de TE, pH 8, cuya composición es la siguiente:

Tris-ClH (merck) 1M.....	10 ml
EDTA (Sigma) 0.5M.....	2 ml
H ₂ O destilada hasta.....	1000 ml

A continuación se añaden 150 μ l de la solución de lisis, de pH 12.6, que se describe a continuación:

Tris (Merck).....	0.606 gr
H ₂ O destilada.....	100 ml
SDS.....	3 gr

Una vez suspendida la cepa en la solución de lisis, se agita suavemente hasta que se obtiene el lisado del microorganismo (30 segundos). A continuación se añade una solución de fenol-cloroformo, se mezcla suavemente y se centrifuga 3 minutos a 15000 rpm en una centrífuga Mikroliter D-7200 (Hettich). La solución de fenol-cloroformo se prepara de la siguiente forma:

Fenol (Merck).....	500 ml
Cloroformo (Merck).....	500 ml
Alcohol isoamílico (Merck).....	10 ml
Hidroxiquinoleína.....	1 gr
H ₂ O destilada estéril.....	100 ml
Sol. 10 x TNE.....	100 ml

Todos estos compuestos se mezclan y se dejan reposar, separando posteriormente la fase acuosa, que es la que se recoge. A continuación se añaden 100 ml de Sol. 1 x TNE, recogiendo nuevamente la fase acuosa; esta última etapa se realiza dos veces consecutivas. La solución de fenol-cloroformo se mantiene en oscuridad hasta su uso.

La composición de la Sol. 10 x TNE y 1 x TNE es:

	1x	10x
Tris (Merck) 1M.....	10 ml.....	100 ml
EDTA (Sigma) 0.5M.....	2 ml.....	20 ml
CINa (Merck) 5M.....	20 ml.....	200 ml
H ₂ O hasta.....	1000 ml.....	1000 ml

Tras la centrifugación, se recoge el sobrenadante y se le añade el colorante en una proporción de 1/5. La composición del colorante es:

Glicerol (Merck) en agua al 30%
Azul de bromofenol (Merck) en agua al 0.25%
Xilencianol en agua al 0.25%

5.2 Electroforésis en gel de agarosa

La agarosa (Sigma) se disuelve en tampón TAE en baño a 100° C en una proporción de un 0.6%. El tampón TAE se realiza de la siguiente forma:

Se disuelven 60.57 gr de Tris en 700 ml de agua destilada, después se añade ácido acético glacial (Merck) hasta conseguir un pH de 8. A continuación se añaden 40 ml de EDTA 0.5M y H₂O hasta 1 litro.

Cuando la agarosa ya está disuelta, se enfría hasta 50° C, se vuelca entonces sobre una plataforma y se coloca un peine de 12 puntas antes de la solidificación del gel para formar los pocillos en los que se colocan las muestras. Una vez que el gel solidifica, se retira el peine y se añaden 10 μ l de cada muestra

por pocillo, en dos de los pocillos se ponen dos cepas control.

El gel se introduce en una cubeta de electroforésis GNA-200 (Pharmacia) cubierto con tampón TAE. La electroforésis se realiza con una fuente de alimentación 2121 (LKB) a 60 voltios y 90 miliamperios durante 3 horas y media. Transcurrido ese tiempo, el gel se tiñe con bromuro de etidio (Merck) durante media hora, se lava con agua destilada y se visualiza con ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta.

6. SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS DE *NEISSERIA GONORRHOEAE*

6.1 Detección de β -lactamasa

En todas las cepas se ha realizado la detección de β -lactamasa. Se lleva a cabo con tiras comerciales de celulosa (Oxoid) empleandose el método conocido como acidométrico en la detección de la enzima.

Para la realización de esta prueba se utiliza un subcultivo en GC de la cepa, de no más de 24 horas.

Una tira comercial de papel se empapa en agua destilada y a continuación se extiende sobre un porta-objetos. Un inóculo de al menos 10 colonias se extiende con un asa de platino sobre la tira de papel. Un cambio de color a amarillo intenso se interpreta como positivo para la producción de β -lactamasa. Este cambio de color se produce generalmente entre 1 y 2 minutos después de extender el inóculo; sin embargo se deja un mínimo de 10 minutos antes de dar la prueba negativa.

6.2 Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMIs)

6.2.1 Antibióticos

El estudio de la CMI frente a penicilina, espectinomícina, tetraciclina, cefoxitin y ceftriaxona se ha realizado en todas las cepas. La procedencia de los antibióticos empleados así como el solvente utilizado en cada caso y las concentraciones probadas se indican a continuación:

ANTIBIOTICO	PROCEDENCIA	SOLVENTE	CONCENTRACION
Penicilina	Antib. S.A.	H ₂ O	128-0.003 mg/l
Espectinomícina	Upjohn	H ₂ O	64-2 mg/l
Tetraciclina	Llorens	H ₂ O	8-0.06 mg/l
Cefoxitina	Merck Sharp	H ₂ O	8-0.06 mg/l
Ceftriaxona	Roche	H ₂ O	0.06-7.10 ⁶ mg/l



Las diluciones de los antibióticos utilizados se preparan siempre a partir de una solución "madre" que se prepara en el momento de hacer el lote de placas para el antibiograma. Esta solución "madre" corresponde a una dilución 10 veces mayor que la concentración más alta que se vaya a utilizar, y a partir de ella, se hacen diluciones medias, hasta obtener el resto de las diluciones.

6.2.2 Medio, inoculación y determinación de la CMI

El medio que se utiliza para las placas de antibióticos es un agar GC con la siguiente composición:

GC agar base.....18 ml
Suplemento de crecimiento.....0.2 ml
Solución del antibiótico.....2 ml

Los lotes de placas siempre se hacen un día antes de su uso, dejándolas 24 horas a temperatura ambiente.

El inóculo de las cepas de gonococo se realiza a partir de un subcultivo de 18-24 horas en GC; para lo cual se hace una suspensión en PBS de pH 6.9 de aproximadamente 10^8 UFC. Las cepas se inoculan con un multirreplicador (Microtiter) que deposita 0.001 ml, con lo que el inóculo final sería de 10^5 UFC. Para la inoculación de las placas, se deposita un volumen de cada suspensión de las cepas en los pocillos de una placa de plástico y con ayuda del multirreplicador se inoculan entre 40 y 50 cepas a la vez en cada prueba. Siempre se incluye una placa de medio sin antibiótico como control de crecimiento.

Las placas ya inoculadas se dejan secar entre 20 y 30 minutos y posteriormente se incuban a 37° C con 5% de CO₂, entre 18 y 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se realiza la lectura del antibiograma, eligiendo como concentración mínima inhibitoria aquella en la cual la cepa ya no crece.

7. ANALISIS DE ISOENZIMAS

El método que hemos empleado en el estudio de polimorfismo enzimático ha sido la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes (Selander y cols., 1986), con algunas modificaciones obteniéndose una serie de patrones electroforéticos. Este estudio se ha llevado a cabo en las 16 cepas patrón de distintas especies del género *Neisseria* descritas en el apartado 1.2.1, en las cepas aisladas de enfermos y/o portadores de distintas especies especificadas en el mismo apartado así como en las 360 cepas de gonococo aisladas de enfermos.

En este trabajo se ha incluido el estudio de detección de actividad de los siguientes enzimas:

Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.....	G6P
Alcohol deshidrogenasa.....	ADH
Malato deshidrogenasa.....	MDH
Enzima Malico.....	ME
Isocitrato deshidrogenasa.....	IDH
Glutamato deshidrogenasa (NAD).....	GD1
Glutamato deshidrogenasa (NADP).....	GD2
Glutámico-oxalacético transaminasa.....	GOT
Fosfatasa Alcalina.....	ALP
Leucina Aminopeptidasa.....	LAP
Fosfoglucomutasa.....	PGM
Fosfoglucosa Isomerasa.....	PGI
6-Fosfogluconato deshidrogenasa.....	6PG

7.1 Preparación de los extractos bacterianos

Hemos sembrado 3 placas de agar GC por cada cepa que ibamos a estudiar. Después de 18-24 horas de incubación a 37° C en atmósfera de 5% de CO₂, con ayuda de un asa de platino se recoge el crecimiento de las 3 placas y se resuspende en 1 ml de tampón Tris-ClH 10 mM pH 8. A continuación las suspensiones se agitan vigorosamente en un Mixer (Lab Line) durante 1 minuto

aproximadamente y se someten a congelación a -20°C durante 48-72 horas, transcurrido dicho tiempo se descongelan con el fin de producir lisis bacteriana. Posteriormente y a fin de conseguir un mayor rendimiento en el lisado las muestras se someten a sonicación en baño (Branson Europa), después de haber sido agitadas de nuevo en el Mixer. La sonicación consistió en dos ciclos de 5 minutos con un intervalo de reposo de 1 minuto entre cada ciclo, esta operación se llevo a cabo con las suspensiones en baño de hielo para evitar la posible desnaturalización de los enzimas.

Una vez que todas las muestras se han sonicado, se centrifugan a 15000 rpm en una centrífuga Mikroliter (Hettich) y el sobrenadante se reparte en tubos Eppendorf a razón de $100\ \mu\text{l}$ en cada tubo, procediéndose a su congelación a -70°C hasta su uso.

7.2 Electroforésis en geles de poliacrilamida

7.2.1 Preparación de los geles

La electroforésis se ha realizado en condiciones no desnaturizantes y con geles discontinuos formados por un gel concentrador y un gel separador.

El gel concentrador se ha empleado al 5% de acrilamida/bisacrilamida al 30% en un tampón tris-ClH 0.125M pH 6.8 cuya composición es la siguiente:

Acrilamida/bisacrilamida 30%.....	1.66 ml
Tris-ClH 0.5M pH 6.8.....	2.5 ml
H ₂ O destilada.....	5.75 ml

La composición de la solución de acrilamida/bisacrilamida al 30% es:

Acrilamida.....	29.2 gr
NN'metilenbisacrilamida.....	0.8 gr
H ₂ O destilada.....	100 ml

Como catalizadores en la polimerización del gel se han empleado TEMED (N,N,N',N' tetrametilendiamina) y persulfato amónico en la siguiente proporción:

TEMED.....1 μ l/ml
Persulfato amónico al 10%.....7 μ l/ml

La concentración del gel separador ha sido del 8% de acrilamida/bisacrilamida al 30% en tampón tris-ClH 0.4M pH 8.8 y se realizó de la siguiente forma:

Acrilamida/bisacrilamida 30%.....2.6 ml
Tris-ClH 1.5M pH 8.8.....2.6 ml
H₂O destilada.....4.725 ml

Para la polimerización del gel se añadieron:

TEMED.....1.5 μ l/ml
Persulfato amónico al 10%.....6 μ l/ml

La electroforésis se ha llevado a cabo en un equipo Miniprotean II (Bio-Rad); inmediatamente después de añadir los catalizadores a la solución del gel separador se vierte en el soporte del que viene provisto el equipo añadiendo encima 1 ml de isobutanol (Merck) con el fin de evitar la exposición del gel al contacto del aire. El tiempo de polimerización es de 45 minutos. Transcurrido ese tiempo se lava varias veces la superficie del gel con agua destilada para eliminar el isobutanol y se añade el gel concentrador a la vez que se introduce un peine de 15 puntas a fin de fabricar los pocillos en los que se inoculará la muestra.

7.2.2 Desarrollo de la Electroforésis

Las muestras obtenidas tras la sonicación se diluyen en un tampón de muestra cuya composición es la siguiente:

Tris ClH 0.5M.....	6.25 ml
Glicerol.....	5 ml
H ₂ O destilada.....	38.75 ml

Dependiendo del enzima a estudiar la dilución que se utiliza es distinta, siendo necesario hacer diversas pruebas hasta conseguir la más óptima resolución.

En los pocillos que previamente hemos preparado se inoculan las muestras poniendo en uno de ellos azul de bromofenol diluido también en tampón de muestra como control del desarrollo de la electroforésis.

La electroforésis se llevó a cabo aplicando un voltaje constante de 80V hasta que el colorante alcanza el final del gel, lo que transcurre en unas 2-3 horas.

El tampón de electrodos que se ha utilizado es tris-glicina pH 8.3 y se prepara de la siguiente forma:

10x	
Tris base.....	30 gr
Glicina (Bio-Rad).....	144 gr
H ₂ O destilada.....	1000 ml

7.3 Tinción de los geles

La tinción de los geles se basa en detectar la actividad enzimática sobre el gel para lo cual es necesaria la adición de un sustrato, un coenzima y un indicador de oxido-reducción que da origen a un compuesto coloreado que pueda ser fácilmente visualizado.

Una vez terminada la electroforésis los geles se incuban en una cubeta de vidrio a 37° C y en oscuridad hasta que aparezcan las bandas lo cual

tiene lugar entre los 2 a los 30 minutos dependiendo del enzima. A continuación los geles se lavan con agua destilada varias veces. Las tinciones específicas que hemos empleado para cada enzima se describen a continuación.

Glucosa 6-Fosfato deshidrogenasa

Glucosa 6-Fosfato (Sigma).....	100 mg
Tris-ClH 0.2M pH 8.....	50 ml
Cl ₂ Mg 0.1M.....	1 ml
NADP ⁺	1 ml
Dimetilthiazol-tetrazolium (MTT)(Sigma).	1 ml
Metosulfato de fenazina (PMS)(Sigma).	0.5 ml

* Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; esta solución se prepara disolviendo 1 gr de NADP en 100 ml de agua destilada, se conserva a 4° C.

La solución de MTT se realiza disolviendo 1.25 gr en 100 ml de agua y el PMS se prepara con 1 gr en 100 ml de agua; una vez preparadas deben conservarse a 4° C y en oscuridad.

Alcohol deshidrogenasa

Etanol (Merck).....	3 ml
Isopropanol (Merck).....	2 ml
Tris-ClH 0.2M pH 8.....	50 ml
NAD ⁺	2 ml
MTT.....	1 ml
PMS.....	0.5 ml

* Nicotinamida adenina dinucleótido; la solución de NAD se prepara disolviendo 1 gr en 100 ml de agua.

Malato deshidrogenasa

Acido málico 2M (Sigma).....	6 ml
Tris-ClH 0.5M pH 7.....	40 ml
NAD.....	2 ml
MTT.....	1 ml
PMS.....	1 ml

Enzima Málico

Acido málico 2M.....	6 ml
Tris-ClH 0.2M pH 8.....	40 ml
Cl ₂ Mg 0.1M.....	2 ml
NADP.....	1 ml
MTT.....	1 ml
PMS.....	0.5 ml

Isocitrato deshidrogenasa

Acido isocítrico 1M (Sigma).....	2 ml
Tris-ClH 0.2M pH 8.....	50 ml
Cl ₂ Mg 0.1M.....	2 ml
NADP.....	1 ml
MTT.....	1 ml
PMS.....	0.5 ml

Glutamato deshidrogenasa (NAD)

Acido L-glutámico (Sigma).....	200 mg
Tris-ClH 0.2M pH 8.....	50 ml
NAD.....	2 ml
MTT.....	1 ml
PMS.....	0.5 ml

Glutamato deshidrogenasa (NADP)

Acido L-glutámico.....	200 mg
Tris-ClH 0.2M pH 8.....	50 ml
NADP.....	1 ml
MTT.....	1 ml
PMS.....	0.5 ml

Glutámico-oxalacético transaminasa

Acido L-aspártico (Sigma).....	50 mg
Piridoxal 5'-fosfato (Sigma).....	1 mg
Acido α -cetoglutámico (Sigma).....	100 mg
Tris-ClH 0.2M pH 8.....	50 ml
Fast Blue BB sal (Sigma).....	100 mg

Fosfatasa Alcalina

Acido β -naftil fosfato (Sigma).....	50 mg
Polivinilpirrolidona (Sigma).....	100 mg
Tris-ClH 0.05M pH 8.5.....	50 ml
ClNa.....	1000 mg
Cl ₂ Mg 0.1M.....	2 ml
Cl ₂ Mn 0.25M.....	2 ml
Fast Blue BB sal (Sigma).....	50 mg

Leucina aminopeptidasa

L-leucina- β naftilamida ClH (Sigma).....	30 mg
KH ₂ PO ₄ 0.1M pH 5.5.....	50 ml
Cl ₂ Mg 0.1M.....	1 ml
Black K salt.....	30 mg

Fosfoglucomutasa

Glucosa 1-fosfato y Glucosa 1,6 difosfato.....	5 mg
Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.....	50 U
NADP.....	0.5 mg
Tris-ClH 0.2 M pH 8.0.....	5 ml
Cl ₂ Mg 0.1M.....	5 ml
Agua destilada.....	25 ml
MTT.....	1 ml
PMS.....	0.5 ml

Fosfoglucosa isomerasa

Fructosa 6-fosfato (Sigma).....	10 mg
Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.....	3 U
NADP.....	6 mg
Tris-ClH 0.2M pH 8.0.....	25 ml
Cl ₂ Mg 0.1M.....	0.3 ml
PMS.....	0.5 ml
MTT.....	1 ml

6-Fosfogluconato deshidrogenasa

Acido 6-fosfogluconico (Sigma).....	10 mg
Tris-ClH 0.2M pH 8.0.....	20 ml
Cl ₂ Mg 0.1M.....	10 ml
NADP.....	1 ml
MTT.....	1 ml
PMS.....	0.5 ml

7.4 Lectura e interpretación de los geles

Después de la tinción, los geles fueron secados en un secador de geles (Bio-Rad) y la lectura de las bandas se realizó visualmente.

Para cada enzima la movilidad relativa de los diferentes patrones enzimáticos obtenidos (electromorfos) se calcula dividiendo la distancia de migración desde el origen por la distancia total recorrida por el azul de bromofenol, el valor resultante se denomina R_m (movilidad relativa). Los electromorfos se enumeran en orden creciente en función de su R_m. Los distintos electromorfos de un enzima se consideran alelos del correspondiente locus génico. A aquellas cepas en las que no se detecta actividad enzimática, después de haber repetido la prueba varias veces, se les asigna el valor cero.

Cada aislamiento se caracteriza por la combinación de electromorfos en los loci enzimáticos estudiados, dando lugar a los distintos Tipos electroforéticos (TE). Por lo tanto cada TE agrupa todas aquellas cepas que presentan idéntica movilidad electroforética de todos sus enzimas analizados.

Para determinar la diversidad genética en los loci estudiados, es necesario conocer las frecuencias de los distintos alelos (electromorfos). Estas frecuencias se calculan a partir del total de TEs encontrados en las cepas estudiadas. La diversidad genética en un locus (h) se calcula aplicando la siguiente fórmula (Nei, 1978):

$$h = 1 - \sum x_i^2 (n/n-1)$$

En donde x_i es la frecuencia del alelo en el locus, n es el número de aislados o TE en la muestra estudiada y $n/n-1$ es un factor de corrección que se emplea en muestras pequeñas. La diversidad genética media es la media aritmética de todas las diversidades genéticas para los loci ensayados.

7.5 Análisis estadístico de los datos

La distancia genética (D) entre pares de aislados puede expresarse por diferentes tipos de coeficientes (Nei, 1975). Para el cálculo de la distancia genética hemos empleado el programa de taxonomía numérica TAXAN (Information Resources Group, Maryland Biotechnology Institute, University of Maryland, College Park, MD 20742 USA), aplicando el coeficiente de distancia total; generándose una matriz de distancias que es utilizada por el programa para realizar el análisis de clusters (agrupamientos) y realizar el diseño de un dendograma en el que se expresa la distribución de los diferentes TE.

El análisis estadístico de los datos obtenidos en este trabajo se ha llevado a cabo con ayuda del programa True-Epistat (Epistat Services) mediante la aplicación de la prueba de χ^2 , el Test exacto de Fisher y el coeficiente de correlación de Pearson (r), según los datos que se querían comparar.

..... **RESULTADOS**

1. SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS

1.1 Distribución anual de cepas de *N. gonorrhoeae* con resistencia.

1.1.1 Sensibilidad a penicilina.

De los 2298 gonococos estudiados, 1899 resultaron ser cepas no productoras de penicilinas (82.6 %), mientras que 399 fueron productoras de β -lactamasa (17.4 %).

Cepas no productoras de penicilinas

En la Tabla IX se pueden observar los resultados de sensibilidad a penicilina que se han obtenido en las cepas de *N. gonorrhoeae* no productoras de penicilinas (no-NGPP). La CMI_{90} , desde 1983 hasta 1991 ha ido experimentando variaciones, obteniéndose los valores más altos en 1985 y 1991 correspondiendo con el aumento en esos años del número de aislamientos con resistencia cromosómica a penicilina. Hay que destacar que en ese periodo de tiempo el valor de la CMI_{90} más bajo corresponde a 1990, año en el que el número de cepas resistentes (1-4 $\mu\text{g/ml}$) fue menor. La CMI_{50} también experimenta oscilaciones durante estos 9 años, alcanzándose los valores más altos en 1985, 1986 y 1991.

En la Figura 1 se refleja la distribución anual de las cepas con resistencia cromosómica a penicilina, observándose una incidencia mayor de este tipo de aislamientos en 1985 y 1991.

El número de cepas con resistencia moderada a penicilina (0.25-0.5 $\mu\text{g/ml}$), en el periodo de tiempo estudiado supone un 26.6%, mientras que los gonococos resistentes (1-4 $\mu\text{g/ml}$) constituyen el 7.1%.

Cepas productoras de penicilinas

En la Tabla IX se pueden observar los resultados de sensibilidad a

penicilina en las 399 cepas NGPP.

En general la CMI_{90} desde 1983 ha ido aumentando con alguna pequeña variación, alcanzándose en 1991 el valor más alto. De forma similar han evolucionado los valores de la CMI_{50} . En la Figura 1 se puede apreciar la incidencia anual de las cepas productoras de β -lactamasa, observándose como este tipo de cepas ha ido en aumento con un ligero descenso en 1986, 1988 y 1990, produciéndose un valor del 34.7 % en 1991.

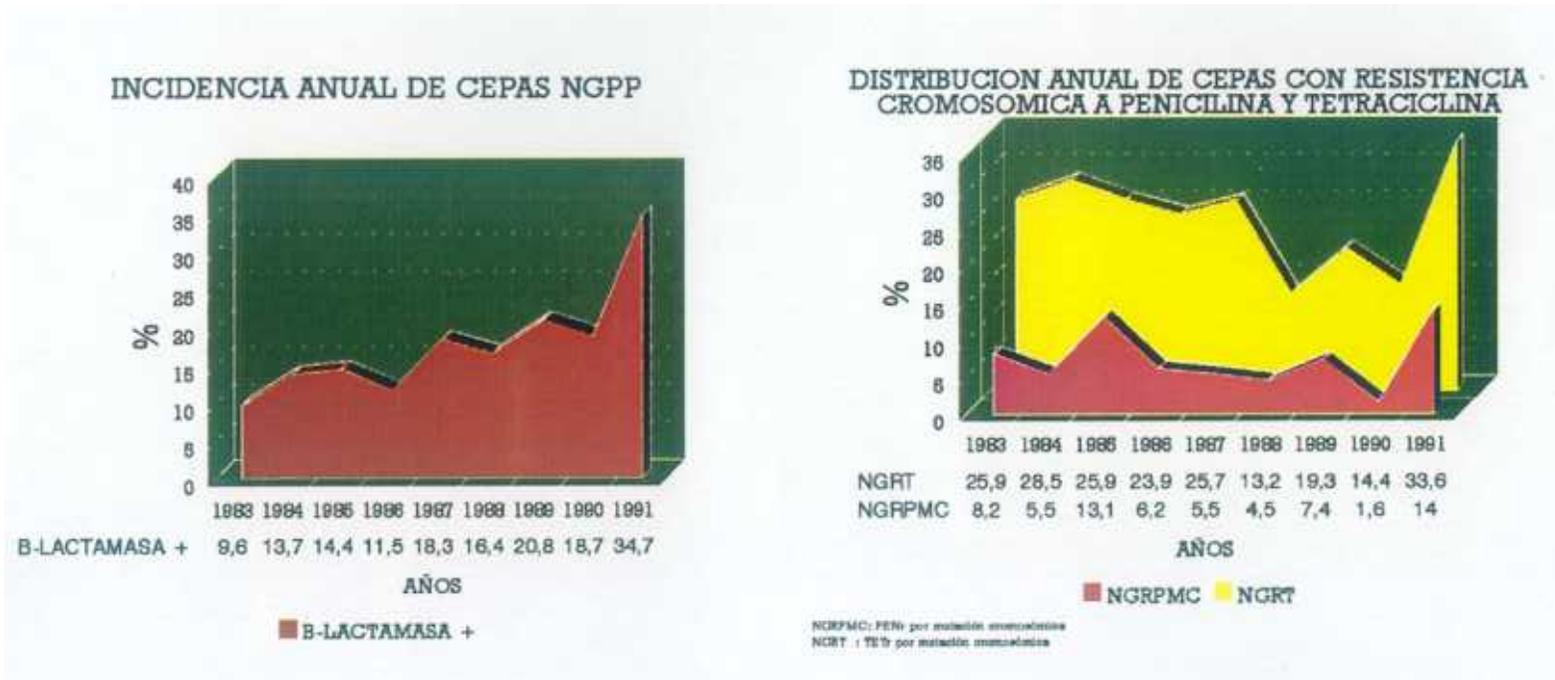
A nivel global en el conjunto de cepas estudiado la CMI_{50} frente a penicilina fue de $0.10 \mu\text{g/ml}$ y la CMI_{90} de $16 \mu\text{g/ml}$.

TABLA IX. SENSIBILIDAD FRENTE A PENICILINA EN CEPAS NO-NGPP Y NGPP

NO NGPP		CMI _s µg/ml					
AÑO	TOTAL CEPAS	0.007 0.03	0.06 0.12	0.25 0.5	1-4	CMI ₅₀	CMI ₉₀
1983	85	28 32.9	32 37.6	18 21.3	7 8.2	0.057	0.44
1984	183	64 34.9	81 33.3	48 26.3	10 5.5	0.077	0.38
1985	244	44 18.1	83 34.0	85 34.8	32 13.1	0.115	0.7
1986	372	72 19.3	153 41.2	124 33.3	23 6.2	0.097	0.4
1987	218	62 28.4	85 39.0	59 27.1	12 5.5	0.076	0.38
1988	265	106 40.0	92 34.7	55 20.8	12 4.5	0.046	0.27
1989	202	74 36.6	68 33.7	45 22.3	15 7.4	0.056	0.38
1990	187	78 41.7	75 40.1	31 16.6	3 1.6	0.042	0.19
1991	143	25 17.5	58 40.5	40 28.0	20 14.0	0.098	0.81
TOTAL	1899	553 29.1	707 37.2	505 26.6	134 7.1	0.09	0.42
NGPP		2-8	16-32	64-128	>128		
1983	9	5 55.5	4 44.5			7.0	17.7
1984	28	10 35.7	15 53.6	3 10.7		11.5	34.1
1985	41	20 48.8	16 39.0	5 12.2		8.5	41.6
1986	42	5 11.9	18 42.8	19 45.3		25.7	113.2
1987	56	11 19.6	13 23.2	32 57.2		39.1	109.7
1988	52	21 40.4	8 15.4	23 44.2		19.9	107.2
1989	53	9 17.0	9 17.0	30 56.6	5 9.4	56.9	127.1
1990	42	9 21.4	11 26.2	20 47.6	2 4.8	36.1	116.6
1991	76	12 15.8	22 28.9	32 42.1	10 13.2	41.9	159.0
TOTAL	399	102 25.6	116 29.1	164 41.1	17 4.2	26.5	112.7

CMI_s correspondientes al total de cepas... CMI₅₀ 0.10 CMI₉₀ 16.0

FIGURA 1.- INCIDENCIA ANUAL DE CEPAS NGPP, NGRPMC Y NGRT



1.1.2 Resistencia a Tetraciclina

En la Tabla X se presentan los resultados de sensibilidad a tetraciclina encontrados en las 1899 cepas de gonococo no productoras de β -lactamasa y las 399 cepas productoras de penicilinasas.

Cepas no productoras de penicilinasas

En el total de aislamientos no-NGPP, el número de cepas con resistencia a tetraciclina (1-8 $\mu\text{g/ml}$) supone un 22.7%. A lo largo del periodo de tiempo estudiado es en 1988 y 1990 donde se obtiene el porcentaje más bajo de gonococos resistentes a este antibiótico, que supone un 13.2% y un 14.4% respectivamente, sin embargo es en 1991 donde se produce el número más elevado de aislamientos de este tipo (33.6 %). Los valores de la CMI_{50} y la CMI_{90} han sufrido ligeras variaciones, situándose a nivel global en el grupo de cepas no productoras de penicilinasas en 0.26 y 0.87 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

La distribución anual de las cepas con resistencia a tetraciclina se puede observar en la Figura 1. Puede observarse en esta figura un paralelismo de picos entre la resistencia a tetraciclina y a penicilina en los últimos años.

Cepas productoras de penicilinasas

En el conjunto de las 399 cepas NGPP, encontramos un 42.1% de cepas con resistencia a tetraciclina, con unos valores de la CMI_{50} y CMI_{90} de 0.44 y 1.20 respectivamente. En 1988 se obtiene el menor número de aislamientos NGPP con resistencia a este antibiótico (7.7 %), incrementándose en años posteriores hasta alcanzar en 1991 el 69.7 %. Desde 1987 los valores de la CMI_{50} inician un descenso hasta 1990, sin embargo en 1991 se produce un importante incremento alcanzando un valor de 0.85 $\mu\text{g/ml}$. En los 8 primeros años del estudio se apreciaba una cierta tendencia a disminuir los valores de la CMI_{90} , sin embargo en 1991 se produce un aumento importante en el valor de la CMI_{90} . Los valores de la CMI_{50} y CMI_{90} en el total de cepas supone un 0.30 y 0.91 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

TABLA X. SENSIBILIDAD FRENTE A TETRACICLINA EN CEPAS NO-NGPP Y NGPP

NO		NGPP				
AÑO	TOTAL CEPAS	CMI _a			CMI ₅₀	CMI ₉₀
		0.06 0.12	0.25 0.5	1-8 μg/ml		
1983	85	20 23.5	43 50.6	22 25.9	0.22	0.95
1984	183	25 13.6	106 57.9	52 28.5	0.35	1.22
1985	244	52 21.3	129 52.8	63 25.9	0.28	0.98
1986	372	63 16.9	220 58.2	89 23.9	0.32	0.89
1987	218	46 21.1	116 53.2	56 25.7	0.30	0.88
1988	265	87 32.8	143 54.0	35 13.2	0.21	0.64
1989	202	67 33.2	96 47.5	39 19.3	0.21	0.77
1990	187	70 37.4	90 48.2	27 14.4	0.19	0.66
1991	143	26 18.2	69 48.2	48 33.6	0.33	0.96
TOTAL	1899	456 24.0	1012 53.3	431 22.7	0.26	0.87
NGPP						
1983	9		1 11.1	8 88.9	0.93	3.10
1984	28		7 25.0	21 75.0	0.69	1.11
1985	41	1 2.4	23 56.1	17 41.5	0.45	1.61
1986	42		25 59.6	17 40.4	0.45	1.83
1987	56		39 69.6	17 30.4	0.41	0.85
1988	52	7 13.5	41 78.8	4 7.7	0.25	0.48
1989	53	4 7.6	35 66.0	14 28.4	0.34	0.86
1990	42	4 9.5	21 50.0	17 39.5	0.39	0.87
1991	76		23 30.3	53 69.7	0.85	1.67
TOTAL	399	16 4.0	215 53.9	168 42.1	0.44	1.20

CMI_a correspondientes al total de cepas ... CMI₅₀ 0.30 CMI₉₀ 0.91

1.1.3 Sensibilidad frente a espectinomicina

Los valores de sensibilidad a espectinomicina encontrados en las 1899 cepas no-NGPP y las 399 NGPP se pueden observar en la Tabla XI.

Los valores de la CMI_{50} y CMI_{90} en estos dos grupos de aislamientos no presentan grandes variaciones a lo largo de los 9 años, siendo éstos de 11.9 y 16.01 respectivamente para los 2298 gonococos estudiados. Cabe resaltar que no hemos encontrado ninguna cepa resistente a este antibiótico.

1.1.4 Sensibilidad frente a Cefoxitina

En la Tabla XII se presentan los valores de sensibilidad a cefoxitina que hemos encontrado en los 1899 aislamientos no-NGPP y los 399 NGPP.

En el periodo de tiempo estudiado, los valores de la CMI_{50} en las cepas no productoras de β -lactamasa han ido descendiendo paulatinamente, observándose un valor de la CMI_{50} de 0.26 para el conjunto de este tipo de cepas. En cuanto a los valores de la CMI_{90} alcanzan el nivel más alto en 1985, apreciándose a partir de ese momento una cierta tendencia a disminuir, sin embargo en 1991 el valor alcanzado es practicamente el mismo que en 1986. La CMI_{90} a nivel global es de 0.87 $\mu\text{g/ml}$.

Dentro de las cepas productoras de penicilinas, hasta 1990, la CMI_{50} sigue la misma tendencia de disminución que en el grupo de cepas anterior, sin embargo en 1991 el valor encontrado es el más alto de los 9 años. Los valores de la CMI_{90} siguen un curso similar a lo observado en las cepas no-NGPP obteniéndose en 1991 el valor más alto.

En el total de las 2298 cepas estudiadas la CMI_{50} es de 0.12 y la CMI_{90} de 0.89.

1.1.5 Sensibilidad frente a Ceftazidima

En la Tabla XIII se incluyen los resultados de sensibilidad a ceftazidima encontrados en 1431 cepas de *N. gonorrhoeae* productoras de penicilinas y 241 cepas no productoras. Los datos que presentamos están referidos al periodo de tiempo de 1983 a 1989 ya que al no emplearse este antibiótico de una forma generalizada en la terapia de la gonorrea se decidió incluir en su lugar el estudio de sensibilidad a ceftriaxona.

Dentro de las cepas no-NGPP se advierte una cierta tendencia en la CMI_{50} a disminuir; en el caso de la CMI_{90} se puede observar el mismo fenómeno. A nivel global la CMI_{50} presenta un valor de 0.01 y la CMI_{90} de 0.03. En lo que se refiere a las cepas NGPP los valores de la CMI_{50} y CMI_{90} no sufren grandes variaciones a lo largo de los años analizados, siendo estos a nivel general de 0.013 y 0.028 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

En el total de las cepas la CMI_{50} es de 0.01 $\mu\text{g/ml}$ y la CMI_{90} de 0.03 $\mu\text{g/ml}$.

1.1.6 Sensibilidad frente a ceftriaxona

En la Tabla XIV se reflejan los valores de sensibilidad a ceftriaxona que hemos encontrado en 695 cepas no-NGPP y 159 NGPP correspondientes éstas últimas al periodo de tiempo desde 1989 a 1991.

Como hemos dicho anteriormente, en 1989 incluimos el estudio de sensibilidad a ceftriaxona, por lo que hemos realizado un muestreo de años anteriores en 216 cepas no productoras de β -lactamasa que son las empleadas en el análisis multienzimático.

Dentro de las no-NGPP, los valores de la CMI_{50} y CMI_{90} no presentan grandes variaciones, unicamente destacar que en 1990 es cuando se obtienen los valores más bajos.

TABLA XI. SENSIBILIDAD FRENTE A ESPECTINOMICINA EN CEPAS NO-NGPP Y NGPP

NO		NGPP						
AÑO	TOTAL CEPAS	CMI _s			$\mu\text{g/ml}$		CMI ₅₀	CMI ₉₀
		2-4	8-16	32				
1983	85	4 4.7	57 67.0	24 28.3			12.8	26.1
1984	183	5 2.7	144 78.6	34 18.7			12.5	23.5
1985	244	5 2.1	199 81.5	40 16.4			12.2	22.2
1986	372	2 0.5	329 88.4	41 11.1			12.3	17.6
1987	218		156 71.5	62 28.5			13.3	26.4
1988	265	3 1.1	251 95.0	11 4.1			11.1	15.4
1989	202	3 1.5	191 94.5	8 4.0			10.6	15.3
1990	187	2 1.1	184 98.4	1 0.5			10.9	15.3
1991	143		113 79.0	30 21.0			12.5	24.4
TOTAL	1899	24 1.3	1624 85.5	259 13.6			11.9	16.01
NGPP								
1983	9	1 11.1	7 77.8	1 11.1			11.3	17.6
1984	28		27 96.4	1 3.6			8.0	14.9
1985	41	2 4.9	39 95.1				7.9	14.3
1986	42		38 90.5	4 9.5			14.8	16.0
1987	56		40 71.4	16 28.6			13.5	26.4
1988	52		50 96.2	2 3.8			10.6	15.3
1989	53		52 98.1	1 1.9			11.4	15.2
1990	43		42 100.0				10.9	14.9
1991	76		52 68.4	24 31.6			13.5	26.9
TOTAL	399	3 0.75	347 87.0	49 12.2			11.6	19.4

CMI_s correspondientes al total de cepas ... CMI₅₀ 11.9 CMI₉₀ 16.01

TABLA XII. SENSIBILIDAD FRENTE A CEFOXITINA EN CEPAS NO-NGPP Y NGPP

NO NGPP						
AÑO	TOTAL CEPAS	CMI _s µg/ml			CMI ₆₀	CMI ₉₀
		0.06 0.12	0.25 0.5	1-4		
1983	85	23 27.0	42 49.4	21 24.6	0.24	0.88
1984	183	16 8.7	120 65.6	47 25.7	0.33	0.91
1985	244	34 13.9	124 50.8	86 35.3	0.37	1.20
1986	372	51 13.7	225 60.5	96 25.8	0.32	0.95
1987	218	41 18.8	136 62.3	40 18.9	0.25	0.80
1988	265	104 39.2	143 54.0	18 6.8	0.16	0.45
1989	202	63 31.2	115 57.0	24 11.8	0.19	0.59
1990	187	30 16.1	139 74.3	18 9.6	0.22	0.49
1991	143	15 10.5	88 61.5	40 28.0	0.18	0.97
TOTAL	1899	377 19.8	1132 59.6	390 20.6	0.26	0.87
NGPP						
1983	9		4 44.4	5 55.6	0.55	0.91
1984	28		12 42.8	16 57.2	0.57	1.07
1985	41		19 46.3	22 53.7	0.55	1.61
1986	42	2 4.8	26 61.9	14 33.3	0.28	1.47
1987	56	13 23.2	40 71.4	3 5.4	0.19	0.45
1988	52	27 51.9	20 38.5	5 9.6	0.11	0.50
1989	53	12 22.6	36 67.9	5 9.5	0.18	0.49
1990	42	9 21.4	28 66.6	5 12.0	0.29	0.61
1991	76		29 67.4	47 61.8	0.60	1.76
TOTAL	399	63 15.8	214 53.6	122 30.6	0.44	1.20

CMI_s correspondientes al total de cepas ... CMI₆₀ 0.12 CMI₉₀ 0.89

En cuanto a las cepas productoras de penicilinasa, observamos igualmente en 1990 la CMI₅₀ y CMI₉₀ más baja de los 3 años estudiados. En 1991 el valor de la CMI₉₀ sufre un incremento importante pasando a ser de 0.01.

En el total de las 854 cepas estudiadas la CMI₅₀ es de 0.0008 y la CMI₉₀ de 0.004.

1.1.7 Sensibilidad frente a ciprofloxacina

En la Tabla XV se presentan los resultados de sensibilidad a ciprofloxacina en 304 cepas no productoras de β -lactamasa que corresponden a las empleadas en el análisis de isoenzimas.

Los valores de la CMI₅₀ y CMI₉₀ a lo largo de los años, no experimentan grandes variaciones, obteniéndose en el total de cepas una CMI₅₀ de 0.002 y una CMI₉₀ de 0.01.

Hay que resaltar que hemos encontrado 9 cepas (3 %) dentro del rango de CMIs de 0.06-0.25. Las cepas con esos valores de la CMI, han sido consideradas por algunos autores como moderadamente resistentes y puesto que el estudio de sensibilidad a ciprofloxacina se ha llevado a cabo en un número reducido de cepas, este porcentaje nos parece reseñable.

TABLA XIII. SENSIBILIDAD FRENTE A CEFTAZIDIMA EN CEPAS NO-NGPP Y NGPP

NO NGPP						
AÑO	TOTAL CEPAS	CMI _s $\mu\text{g/ml}$			CMI ₅₀	CMI ₉₀
		0.003 0.007	0.015 0.03	0.06 0.12		
1983	85	15 17.6	56 65.9	14 16.5	0.018	0.05
1984	183	51 27.9	102 41.8	30 16.3	0.012	0.05
1985	244	55 22.5	142 58.2	47 19.3	0.012	0.06
1986	372	105 28.2	233 62.6	34 9.2	0.011	0.03
1987	218	63 28.9	138 63.3	17 7.8	0.011	0.03
1988	265	94 35.5	155 58.5	16 6.0	0.009	0.03
1989	64	30 46.9	27 42.2	7 10.9	0.008	0.03
TOTAL	1431	413 28.9	853 59.6	165 11.5	0.01	0.03
NGPP						
1983	9	1 11.1	8 88.9		0.016	0.027
1984	28	3 10.7	24 85.7	1 3.6	0.019	0.028
1985	41	5 12.2	33 80.5	3 7.3	0.013	0.028
1986	42	4 9.5	34 81.0	4 9.5	0.012	0.039
1987	56	5 8.9	50 89.3	1 1.8	0.013	0.027
1988	52	11 21.2	40 78.0	1 1.9	0.013	0.027
1989	13	4 30.8	7 53.8	2 15.4	0.011	0.04
TOTAL	241	33 13.7	196 81.3	12 5.0	0.013	0.028

CMI_s correspondientes al total de cepas ... CMI₅₀ 0.01 CMI₉₀ 0.03

TABLA XIV. SENSIBILIDAD FRENTE A CEFTRIAXONA EN CEPAS NO-NGPP Y NGPP

NO		NGPP				
AÑO	TOTAL CEPAS	CMI _s			CMI ₅₀	CMI ₉₀
		0.00007 0.0003	0.0007 0.003	μg/ml 0.007 0.06		
1983	37	17 45.9	18 35.1	2 5.4	0.0003	0.001
1984	38	17 44.7	19 50.1	2 5.2	0.0003	0.002
1985	34	11 32.4	21 61.7	2 5.9	0.0005	0.002
1986	38	4 10.5	21 55.3	13 34.2	0.002	0.006
1987	33	4 12.2	22 66.6	7 21.2	0.001	0.005
1988	36	4 11.2	21 58.3	11 30.5	0.002	0.005
1989	149		130 87.2	19 12.8	0.001	0.004
1990	187	160 85.5	26 14.0	1 0.5	0.00006	0.0005
1991	143	20 14.0	99 69.2	24 16.8	0.001	0.004
TOTAL	695	237 34.1	377 54.2	81 11.7	0.0006	0.004
NGPP						
1989	40		37 92.5	3 7.5	0.001	0.003
1990	43	36 83.8	7 16.2		0.00006	0.0006
1991	76		50 65.7	26 34.3	0.002	0.01
TOTAL	159	36 22.6	94 59.2	29 18.2	0.001	0.005

CMI_s correspondientes al total de cepas... CMI₅₀ 0.0008 CMI₉₀ 0.004

TABLA XV. SENSIBILIDAD FRENTE A CIPROFLOXACINA EN CEPAS NO-NGPP

NO NGPP							
AÑO	TOTAL CEPAS	CMI _s		μg/ml		CMI ₅₀	CMI ₈₀
		0.0007 0.003	0.007 0.03	0.06 0.25			
1983	37	3 8.1	34 91.9			0.004	0.009
1984	38	3 7.9	31 81.6	4 10.5		0.005	0.03
1985	34	10 29.4	22 64.7	2 5.9		0.005	0.01
1986	39	32 82.0	6 15.4	1 2.6		0.002	0.009
1987	33	31 94.0	1 3.0	1 3.0		0.002	0.003
1988	36	31 86.1	5 13.9			0.001	0.004
1989	17	14 82.4	3 17.6			0.001	0.009
1990	32	31 96.9		1 3.1		0.001	0.001
1991	38	29 76.3	9 23.7			0.001	0.003
TOTAL	304	184 60.5	111 36.5	9 3.0		0.002	0.01

1.2 Distribución geográfica

1.2.1 Resistencia a penicilina

En la Figura 2 se puede observar la distribución geográfica de las cepas productoras de penicilinasasa (NGPP), cepas con resistencia a penicilina por mutación cromosómica (NGRPMC) y cepas con resistencia a tetraciclina (NGRT), en las principales Comunidades Autónomas de las que se han recibido cepas.

Dentro del grupo de las NGPP Aragón no presenta diferencias estadísticamente significativas con el resto de Comunidades Autónomas, sin embargo, dado el reducido número de cepas y procediendo todas del mismo año, no podemos asegurar cual es la situación real.

En Asturias y Baleares encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) en relación al resto de las Comunidades Autónomas.

Cataluña es la Comunidad que estadísticamente tiene mayor número de cepas productoras de β -lactamasa, no encontrándose diferencias significativas ($p < 0.01$) con Castilla-León, pero sí con el resto de las Comunidades.

En el conjunto de cepas no productoras de penicilinasasa habría que mencionar de nuevo lo dicho para el caso de Aragón. En el resto de las Comunidades no hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$).

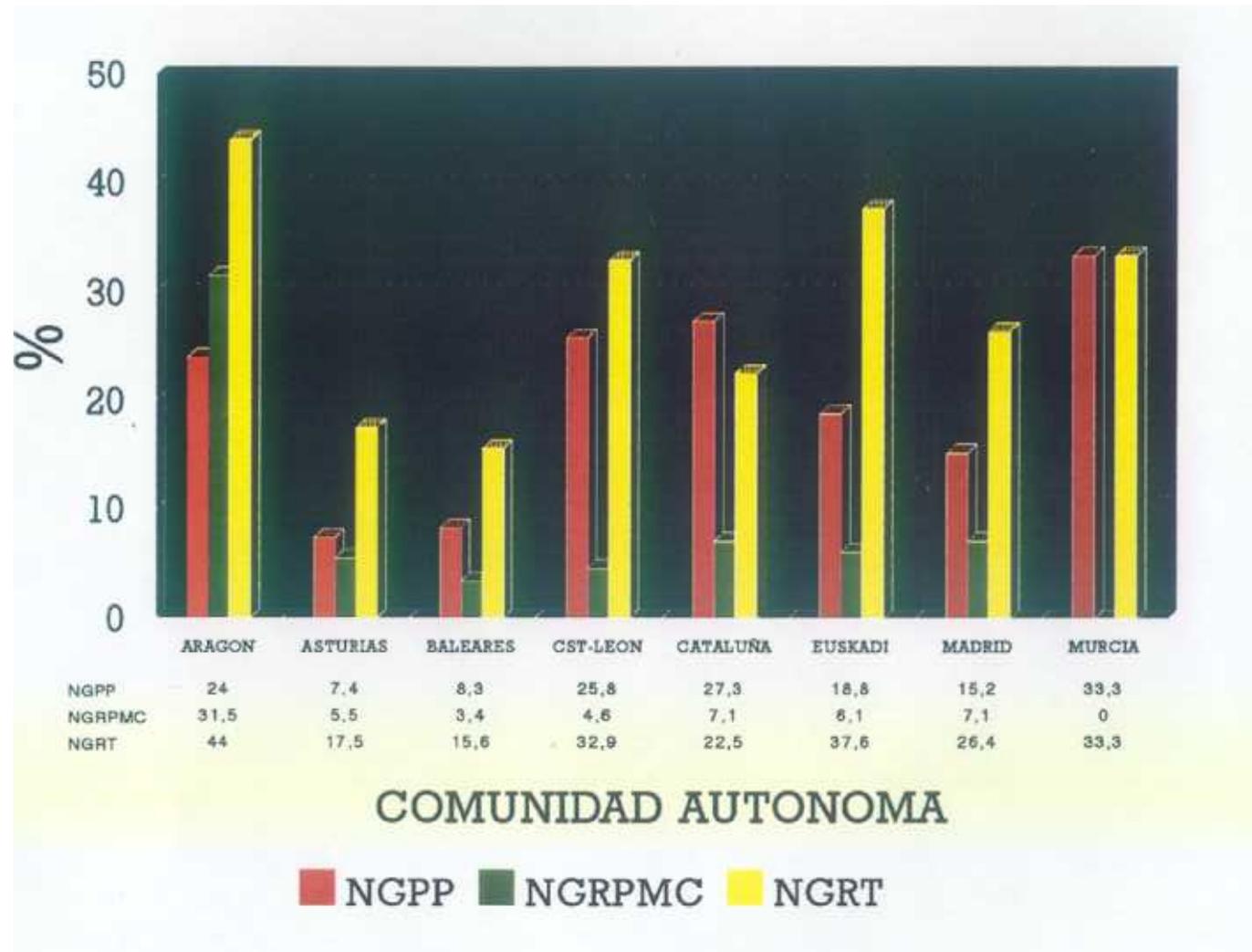
Es destacable el caso de Murcia que si bien el número de cepas es muy pequeño, no existe ningún aislamiento con resistencia a penicilina por mutación cromosómica.

En cuanto a la distribución geográfica de las cepas con resistencia a tetraciclina, en Aragón es donde se presenta el porcentaje más alto de cepas resistentes, si bien por lo dicho anteriormente no se puede hacer una estadística fiable.

Euskadi y Castilla-León representan las Comunidades con un porcentaje más alto de cepas resistentes a este antibiótico con unas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) del resto.

Hay que destacar que aunque Baleares y Asturias presentan menos cepas resistentes a tetraciclina que Cataluña y Madrid, sin embargo, no se encuentran diferencias significativas.

FIGURA 2.- DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE CEPAS NGPP, NGRPMC Y NGRT



1.3 Correlación de la sensibilidad frente a penicilina con la obtenida frente a otros antimicrobianos

Hemos comparado la sensibilidad a penicilina frente al resto de los antimicrobianos utilizados en el estudio.

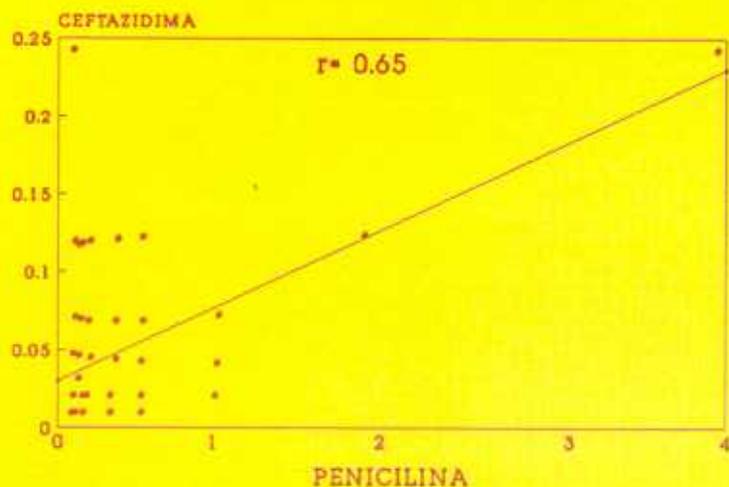
La comparación se realizó entre la sensibilidad a penicilina y la sensibilidad frente a tetraciclina, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacina y espectinomicina, obteniéndose unos coeficientes de correlación de Pearson (r) de 0.42, 0.65, 0.49, 0.58, 0.2 y 0.06 respectivamente. Dichos coeficientes de correlación resultaron ser todos ellos estadísticamente significativos ($p < 0.01$) excepto en el caso de la espectinomicina ($r = 0.06$).

La recta de regresión resultante nos permite predecir el 18% de los resultados de tetraciclina, el 24.6% de los de cefoxitina, el 34.4% de los de ceftriaxona y solamente el 4.1% de los de ciprofloxacina, todos ellos en función de los resultados de sensibilidad a penicilina.

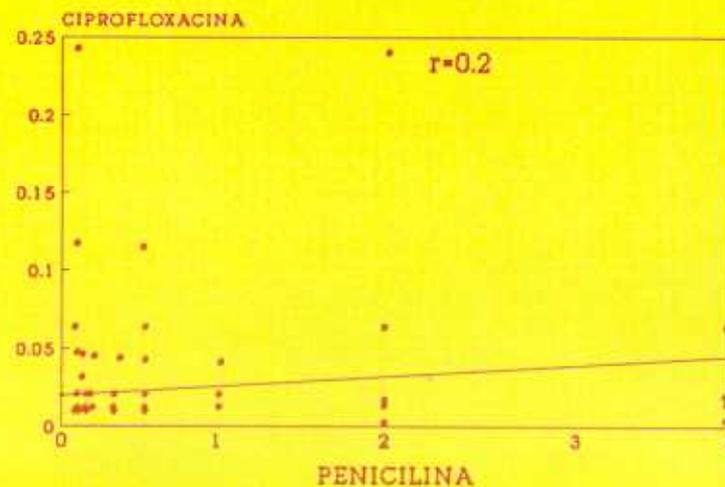
En la Figura 3 se presentan las rectas de regresión correspondientes a las comparaciones que ofrecieron los valores más alto y más bajo del coeficiente de correlación (penicilina/ceftazidima $r = 0.65$; penicilina/ciprofloxacina $r = 0.2$).

FIGURA 3.- CORRELACION OBSERVADA ENTRE PENICILINA CON CEFTAZIDIMA Y CIPROFLOXACINA

RECTA DE REGRESION, CORRELACION ENTRE PENICILINA Y CEFTAZIDIMA



RECTA DE REGRESION, CORRELACION ENTRE PENICILINA Y CIPROFLOXACINA



2. SEROVARIEDADES

2.1 Distribución global de serotipos IA y IB

En las 2298 cepas de *N. gonorrhoeae* se ha realizado la serotipia frente a la proteína I, utilizando anticuerpos monoclonales.

En la Figura 4 se observa la distribución global de serotipos y su distribución geográfica en diferentes Comunidades Autónomas. El serotipo mayoritario ha sido el IB (74.6 %), mientras que el 25.4 % de los aislados correspondían al serotipo IA.

En la distribución geográfica de los serotipos IA y IB en las diferentes Comunidades Autónomas, cabe destacar la escasa presencia del serotipo IA (6.7 %) en las cepas aisladas en Baleares. En Aragón y Murcia, al contar con muy pocas cepas, no podemos asegurar si los datos obtenidos reflejan la realidad. En el resto de las Comunidades la proporción de los serotipos se asemeja a la obtenida en la distribución global.

2.2 Determinación de serovariedades

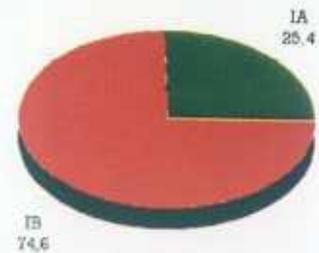
La aplicación de anticuerpos monoclonales frente a epítomos diferentes de la proteína I para la determinación de serovariedades se ha realizado en las 2298 cepas de *N. gonorrhoeae*.

En la Figura 5 se puede observar la distribución global de serovariedades en cepas de serotipo IA, así como en cepas IA productoras y no productoras de penicilinasas.

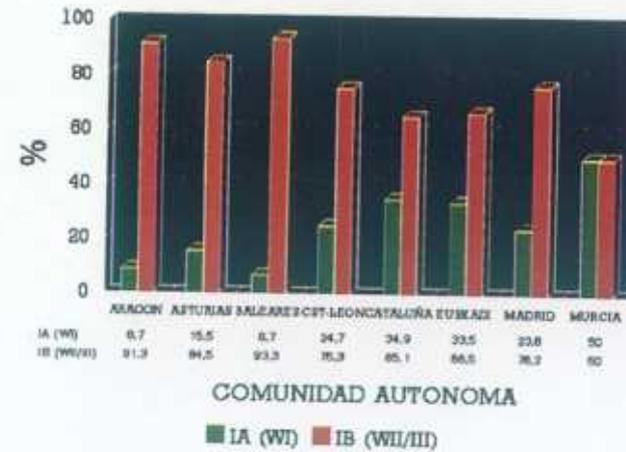
La serovariedad mayoritaria es la IA/rst a la que pertenecen un 47.9 % de las cepas, seguida de la IA/v con una frecuencia de un 24.5 %. El resto de las serovariedades

FIGURA 4.- DISTRIBUCION DE LOS SEROTIPOS IA Y IB

DISTRIBUCION GLOBAL DE LOS SEROTIPOS

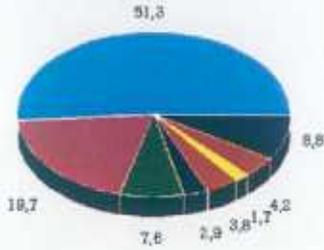
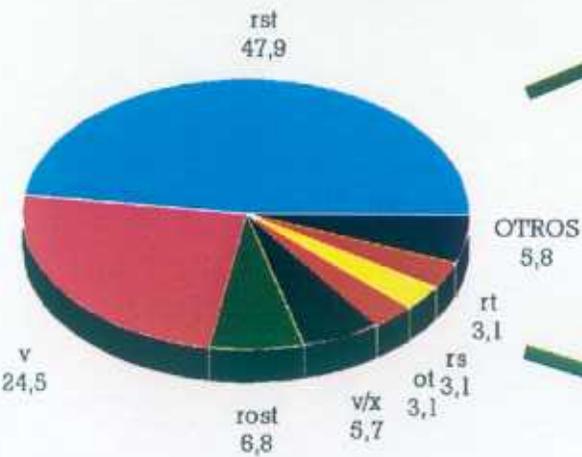


DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LOS SEROTIPOS IA Y IB

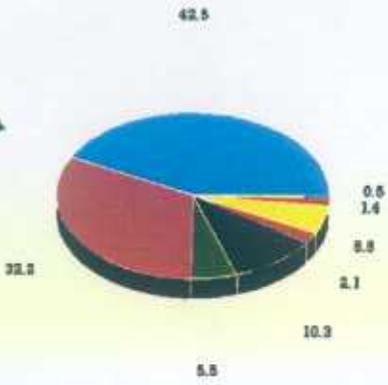


DISTRIBUCION DE LAS SEROVARIEDADES EN CEPAS IA NO-NGPPP

FIGURA 5.- DISTRIBUCION GLOBAL DE SEROVARIEDADES EN CEPAS IA



DISTRIBUCION DE SEROVARIEDADES EN CEPAS IA NGPPP



son menos abundantes, no encontrándose ninguna de ellas en más del 7 % de las cepas estudiadas.

Dentro de las cepas no-NGPP, la distribución de serovariedades es similar a la encontrada en el global de cepas, aunque con alguna diferencia que conviene resaltar, como el caso de las cepas IA v/x que se encuentran en menor proporción.

En el conjunto de cepas productoras de β -lactamasa, el 95 % de ellas pertenecen a las 7 serovariedades más abundantes. Los gonococos de serovar IA/v y IAv/x presentan una mayor incidencia que la encontrada en el total de cepas.

En la Figura 6 se refleja la distribución global de serovariedades en cepas de serotipo IB, y la distribución en cepas IB no-NGPP y NGPP. En la Tabla XVII se presentan las 83 serovariedades diferentes encontradas de las cuales 8 han sido las más frecuentes.

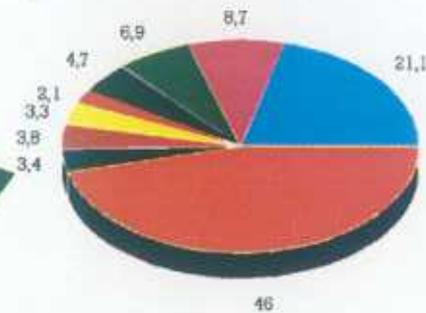
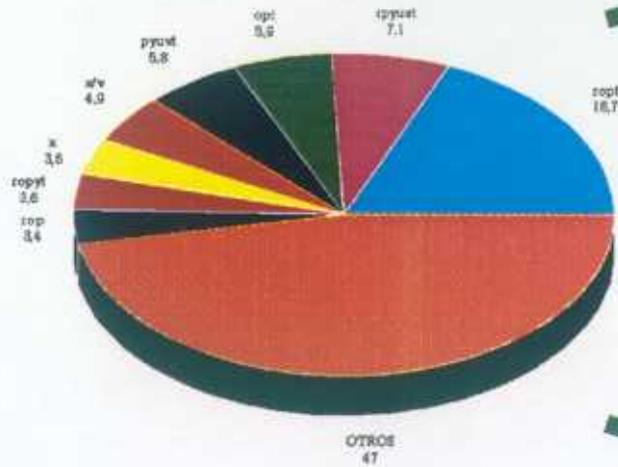
En el grupo de cepas IB no productoras de penicilinas la situación es muy parecida a la encontrada a nivel global, aunque destacando un descenso en la frecuencia de cepas IB x/v. Dentro del conjunto de gonococos productores de β -lactamasa hay que resaltar la escasa presencia de cepas IB/rpyust, así como el incremento de las serovariedades IB x/v y IB/pyuvt.

2.2.1 Distribución anual

En la Tabla XVI se puede observar la frecuencia anual de serovariedades en cepas de serotipo IA. En la Figura 7 se refleja la distribución anual de las principales serovariedades encontradas en cepas de *N. gonorrhoeae* de serotipo IA. El número de serovariedades distintas encontradas ha sido 16.

DISTRIBUCION DE LAS SEROVARIEDADES EN CEPAS IB NO-NGFP

FIGURA 8.- DISTRIBUCION GLOBAL DE SEROVARIEDADES EN CEPAS IB



DISTRIBUCION DE SEROVARIEDADES EN CEPAS IB NGFP

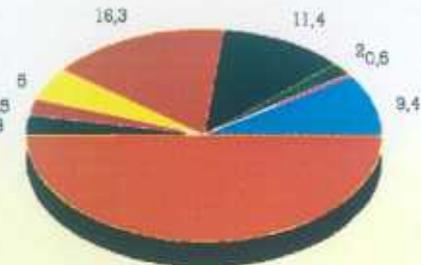
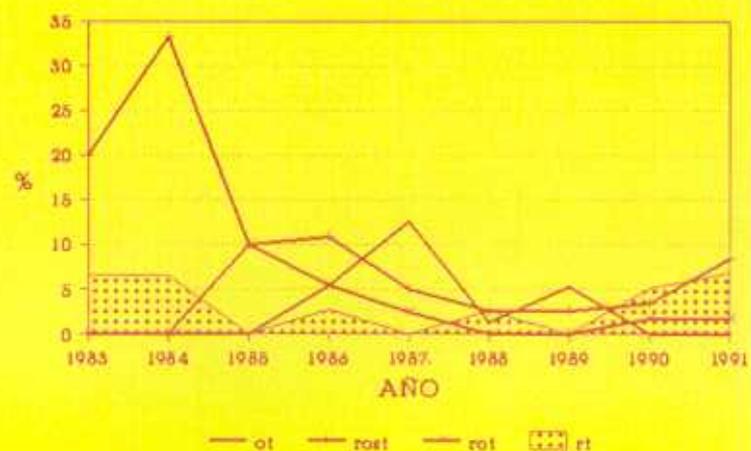
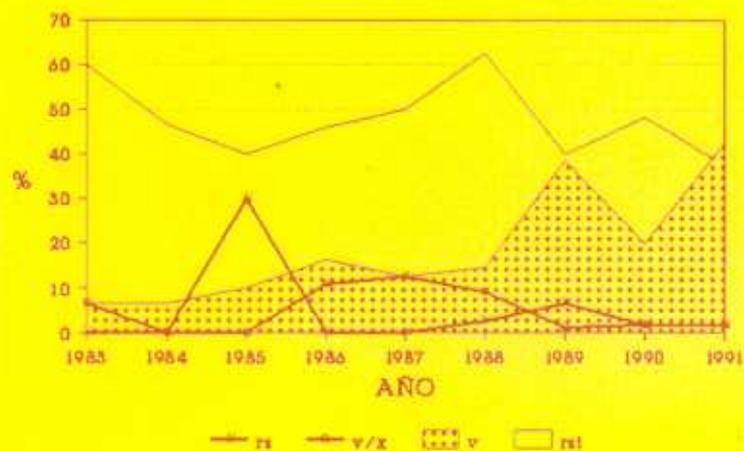


TABLA XVI. DISTRIBUCION ANUAL DE SEROVARIEDADES EN CEPAS DE SEROTIPO IA

SEROVAR	AÑO									TOTAL
	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	
o							1 1.3	1 1.7		2 0.5
ost		1 6.6								1 0.3
ot				2 5.4	5 12.5	1 1.3	4 5.3			12 3.1
r								3 5.2		3 0.8
ro				1 2.7		1 1.3				2 0.5
ros							1 1.3	2 3.4		3 0.8
rost	3 20.0	5 33.3	1 10.0	4 10.8	2 5.0	2 2.6	2 2.6	2 3.4	5 8.5	26 6.8
rot			1 10.0	2 10.8	1 2.5			1 1.7	1 1.7	6 1.6
rs			3 30.0			2 26.0	5 6.6	1 1.7	1 1.7	12 3.1
rst	9 60.0	7 46.6	4 40.0	17 45.9	20 50.0	47 62.6	30 40.0	28 48.3	22 37.3	184 47.9
rsv						1 1.3				1 0.2
rt	1 6.6	1 6.6		1 2.7		2 2.6		3 5.2	4 6.8	12 3.1
st							1 1.3			1 0.2
t						1 1.3	1 1.3	1 1.7		3 0.8
v	1 6.6	1 6.6	1 10.0	6 16.2	5 12.5	11 14.6	29 38.6	15 20.0	25 42.4	94 24.5
v/x	1 6.6			4 10.8	7 12.5	7 9.3	1 1.3	1 1.7	1 1.7	22 5.7
TOTAL	15	15	10	37	40	75	75	58	59	384
NUMERO DE SEROVARs	5	5	5	8	6	10	10	11	7	16

FIGURA 7.- DISTRIBUCION ANUAL DE SEROVARIEDADES EN CEPAS DE SEROTIPO IA



Lo más destacable es el drástico descenso en la frecuencia de cepas IA/rst a partir de 1984, pasando de un 33.3 % en este año a un 8.5 % en 1991; mientras que por el contrario la serovariedad IA/v ha pasado a ser en 1991 la más abundante.

En cuanto al número total de serovariedades encontradas por año, no existen grandes diferencias a lo largo del periodo de tiempo estudiado.

En la Figura 8 se presenta la distribución anual de las principales serovariedades en cepas productoras de β -lactamasa de serotipo IA. El porcentaje de cepas IA/rst se mantiene sin grandes variaciones a lo largo de los 9 años, excepto en 1989 en el que la frecuencia de este tipo de cepas disminuye bruscamente, recuperándose en los años siguientes. Hay que resaltar el aumento creciente desde 1986 de la serovariedad IA/v; en cambio la presencia de aislamientos de serovariedad IA v/x pasa de un 30% en 1986 hasta un 3 % en 1991.

En la Tabla XVII encontramos la frecuencia anual de serovariedades en cepas de *N. gonorrhoeae* de serotipo IB. En la Figura 9 se puede observar la distribución anual de las principales serovariedades en cepas de serotipo IB.

El conjunto de gonococos de serotipo IB se distribuye en 83 serovariedades diferentes. Es llamativo el incremento de cepas IB/oys y IB/ys, que suponen en 1991 el 10 % y el 6.9 % respectivamente. Así mismo hay que resaltar el descenso paulatino a lo largo de estos años en la frecuencia de cepas IB/x y IB/rpyst no encontrándose de estas última ningún aislamiento en 1991.

En el número total de serovariedades distintas encontradas por año, se produce un aumento progresivo desde 1983 en el que solo se presentaban 11, hasta 1991 en el que las cepas se agrupan en 43 serovariedades diferentes.

En la Figura 10 se refleja la distribución anual de las principales serovariedades de cepas productoras de penicilinas de serotipo IB. Hay que resaltar que los gonococos IB/opyt que en 1984 representan alrededor del 7 %,

desaparecen en 1986, volviendo a surgir en 1991 con una frecuencia cercana al 10 %.

Habría que señalar también el importante incremento de cepas IB/oys que en 1991 supone prácticamente el 20 % del total de cepas NGPP de serotipo IB. En cuanto a los aislamientos IB/ropt y IB x/v, es notorio el descenso que se produce a lo largo de estos años.

2.2.2 Distribución geográfica

En la Figura 11 se observa la distribución geográfica de las serovariedades de cepas con serotipo IA.

La serovariedad IA/rst es la más abundante en todas las Comunidades Autónomas excepto en Asturias donde las cepas IA/v son las más abundantes y Baleares que presenta una frecuencia igual de cepas IA/rost y IA/rst.

La distribución por Comunidades Autónomas de las principales serovariedades encontradas en cepas con serotipo IB, se presenta en la Figura 12.

Las cepas IB/ropt son las más abundantes en todas las Comunidades, presentando Asturias el porcentaje más alto de cepas de este tipo; la excepción es Baleares donde los aislamientos IB/rpyust son los más frecuentes.

FIGURA 8.- DISTRIBUCION ANUAL DE LAS SEROVARIEDADES DE CEPAS NGPP DE SEROTIPO IA

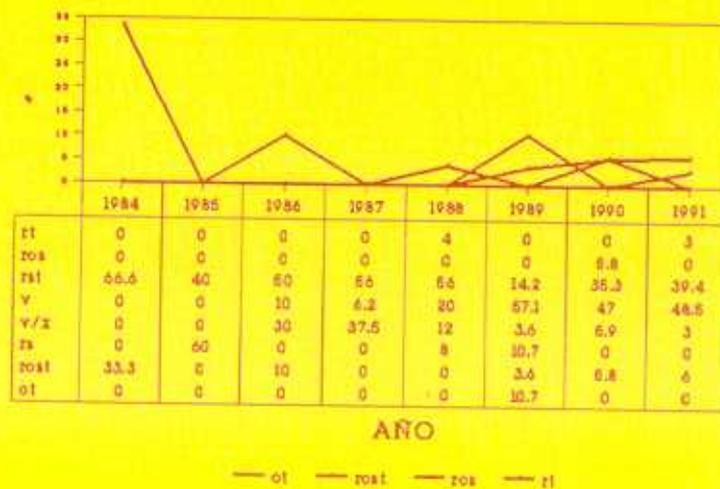
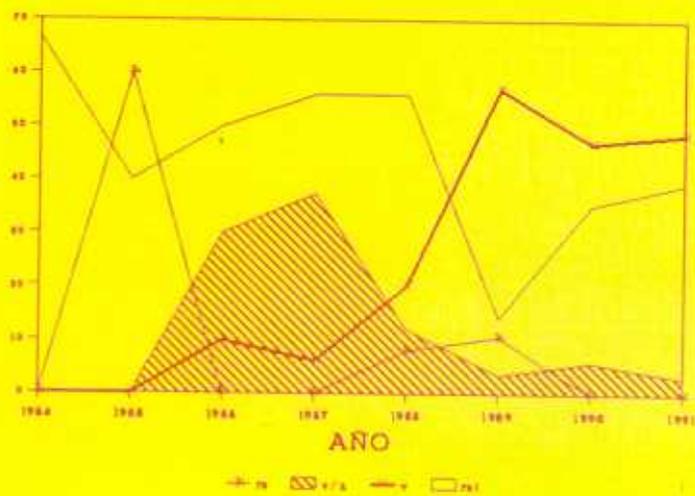


TABLA XVII. DISTRIBUCION ANUAL DE SEROVARIEDADES EN CEPAS DE SEROTIPO IB

SEROVAR	AÑO									TOTAL
	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	
o								1 0.6	1 0.6	2 0.2
op					1 0.8					1 0.1
opst		1 2.9			1 0.8	1 0.5	3 1.7	1 0.6	1 0.6	8 0.8
opt		1 2.9		4 4.3	11 9.5	16 8.8	10 5.5	13 7.5	5 3.1	60 5.9
opust								1 0.6		1 0.1
oput						2 1.0				2 0.2
opvt				1 1.1		1 0.5	1 0.5		8 5.0	11 1.1
opyst	3 13.0	2 5.8	1 1.9	3 3.3	4 3.5	3 1.6	2 1.1	2 1.2	2 1.2	22 2.2
opysvt								1 0.6		1 0.1
opyt		1 2.9	2 3.8		3 2.6	2 1.0	3 1.7	2 1.2	6 3.7	19 1.9
opyu							1 0.5			1 0.1
opyust				1 1.1		2 1.0	2 1.1	2 1.2	2 1.2	9 0.9
opyut			1 1.9	1 1.1	1 0.8		2 1.1	2 1.2		6 0.6
opyvvt				1 1.1	1 0.8		19 10.5	7 4.0		28 2.8
opyv									2 1.2	2 0.2
opyvs									1 0.6	1 0.1
opyvt							1 0.5	1 0.6	1 0.6	3 0.3
os									1 0.6	1 0.1
ost				1 1.1						1 0.1
ot								1 0.6		1 0.1

TABLA XVII. DISTRIBUCION ANUAL DE SEROVARIEDADES EN CEPAS DE SEROTIPO IB

SEROVAR	AÑO									TOTAL
	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	
ots									1 0.6	1 0.1
ovst									2 1.2	2 0.2
oys			2 3.8				1 0.5	3 1.7	18 10.0	22 2.2
oyst				1 1.1		1 0.5				2 0.2
oysv									1 0.6	1 0.1
oyt						1 0.5				1 0.1
oyvs								1 0.6		1 0.1
oyvst									1 0.6	1 0.1
pust						1 0.5				1 0.1
puv								1 0.6		1 0.1
puvst								1 0.6		1 0.1
pyst			1 1.9	1 1.1	2 1.6	4 2.2	5 2.8		4 2.5	17 1.7
pyt							1 0.5			1 0.1
pyust		1 2.9		3 3.3	4 3.5	3 1.6	6 3.3		1 0.6	18 1.8
pyut					1 0.8			1 0.6		2 0.2
pyvst			7 13.2	5 5.5	14 12.2	13 7.0	15 8.3	6 3.5	1 0.6	61 6.0
pyvt			1 1.9			7 3.8	1 0.5	1 0.6	1 0.6	44 4.3



TABLA XVII. DISTRIBUCION ANUAL DE SEROVARIEDADES EN CEPAS DE SEROTIPO IB

SEROVAR	AÑO									TOTAL
	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	
r		1 2.9								1 0.1
rop	2 8.7	3 8.8	4 7.5	5 5.4	3 2.6	4 2.1	7 3.9	2 1.2	4 2.5	34 3.4
ropst					3 2.6	6 3.2	4 2.2	6 3.5		19 1.9
ropt	3 13.0	6 17.6	9 17.0	17 18.7	17 14.8	64 34.6	34 18.9	30 17.4	10 6.2	190 18.7
ropu			2 3.8	2 2.2					2 1.2	6 0.6
ropust					1 0.8		2 1.1			3 0.3
roput	1 4.3			2 2.2	1 0.8			1 0.6		5 0.5
ropuvt									3 1.9	3 0.3
ropvt	1 4.3	1 2.9	1 1.9			1 0.5	1 0.5		6 3.7	11 1.1
ropyst	1 4.3	3 8.8	2 3.8	1 1.1	2 1.6	2 1.0	1 0.5	4 2.3		16 1.6
ropyt			1 1.9	7 7.6	2 1.6	3 1.6	10 5.5	9 5.2	4 2.5	36 3.6
ropyu								1 0.6		1 0.1
ropyust				2 2.2	1 0.8		2 1.1	12 6.9	4 2.5	21 2.1
ropyut		1 2.9		1 1.1		1 0.5	5 2.8	4 2.3	2 1.2	14 1.4
ropyuv									1 0.6	1 0.1
ropyust		1 2.9					1 0.5			2 0.2
ropyuvt							1 0.5	1 0.6	1 0.6	3 0.3

TABLA XVII. DISTRIBUCION ANUAL DE SEROVARIEDADES EN CEPAS DE SEROTIPO IB

SEROVAR	AÑO									TOTAL
	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	
ropyvt		1 2.9	1 1.9						6 3.7	8 0.8
rot							2 1.1			2 0.2
rp	1 4.3									1 0.1
rpst						1 0.5				1 0.1
rpt						12 6.5	3 1.7	2 1.2	5 3.1	22 2.2
rput								1 0.6	2 1.2	3 0.3
rpvt						1 0.5				1 0.1
ropy								1 0.6		1 0.1
rpys							1 0.5			1 0.1
ropyt		4 11.7	2 3.8		3 2.6	2 1.0	4 2.2	3 1.7		18 1.8
rypt	1 4.3			1 1.1		1 0.5	4 2.2	3 1.7	9 5.6	19 1.9
rypu							2 1.1	2 1.2	1 0.6	5 0.5
rypus								1 0.5		1 0.1
ryyust			2 3.8	6 6.5	8 6.9	4 2.2	13 7.2	25 14.5	15 9.3	73 7.3
ryyut				2 2.2	2 1.6	3 1.6	3 16.6	1 0.6		11 1.1
ryyuvst	1 4.3			2 2.2	1 0.8				2 1.2	6 0.6
ryyvt			1 1.9		1 0.8			1 0.6	3 1.9	6 0.6

TABLA XVII. DISTRIBUCION ANUAL DE SEROVARIEDADES EN CEPAS DE SEROTIPO IB

SEROVAR	AÑO									TOTAL
	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	
ryvt						1 0.5			1 0.6	2 0.2
rst				1 1.1						1 0.1
ryust									1 0.6	1 0.1
x	4 17.4	4 11.7		8 8.7	5 4.3	10 5.4	4 2.2	2 1.2		37 3.6
x/v		1 2.9	6 11.3	10 10.9	22 19.1	7 3.8	2 1.1	2 1.2		50 4.9
ys			1 1.9	1 1.1				2 1.2	11 6.9	15 1.5
yst						1 0.5				1 0.1
yus								2 1.2	1 0.6	3 0.3
yust				1 1.1				1 0.6	1 0.6	3 0.3
yvvt	5 21.7	2 5.8	6 11.3	1 1.1		1 0.5	1 0.5	4 2.3	8 5.0	28 2.8
yvt						3 1.6				3 0.3
TOTAL	23	34	53	92	115	185	180	172	160	1014
NUMERO DE SEROVARs	11	17	20	29	26	35	38	45	43	83

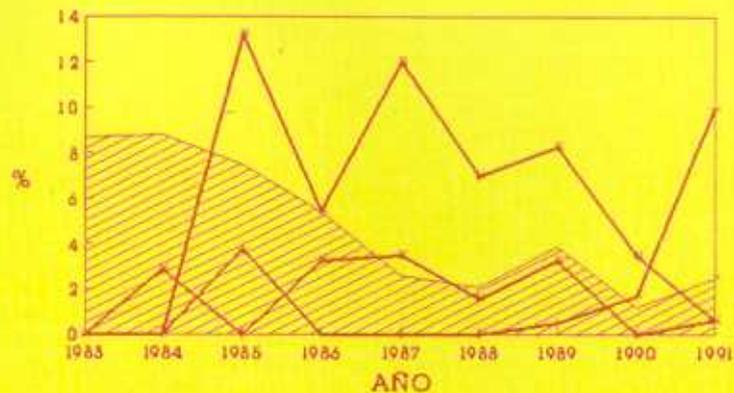
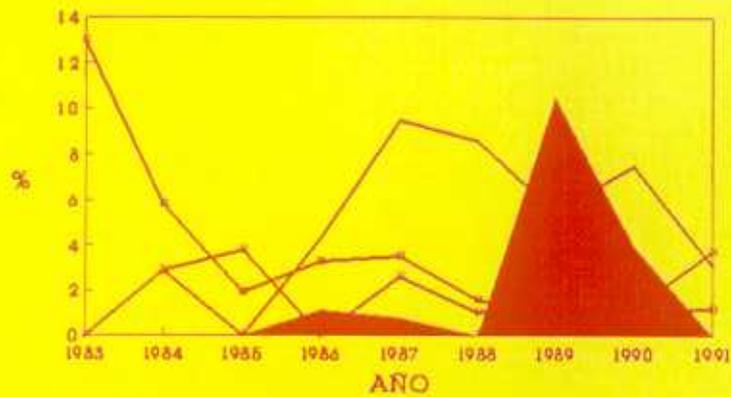
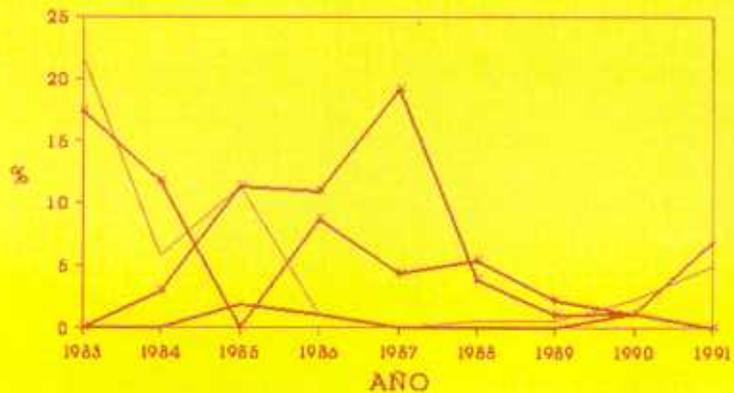
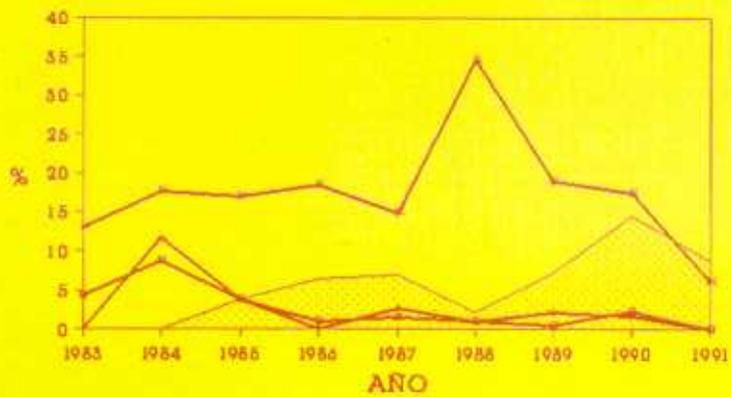
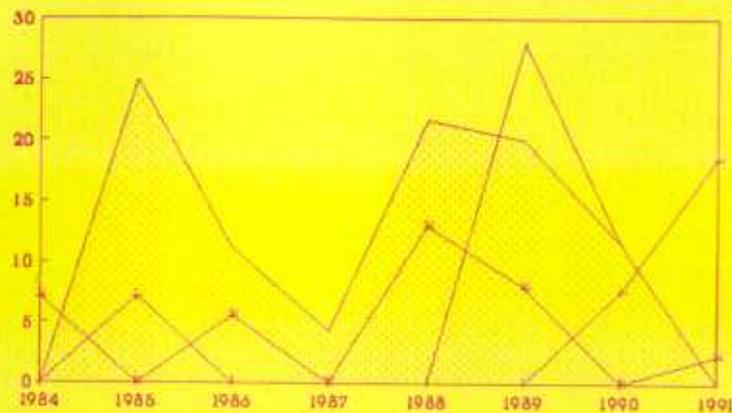
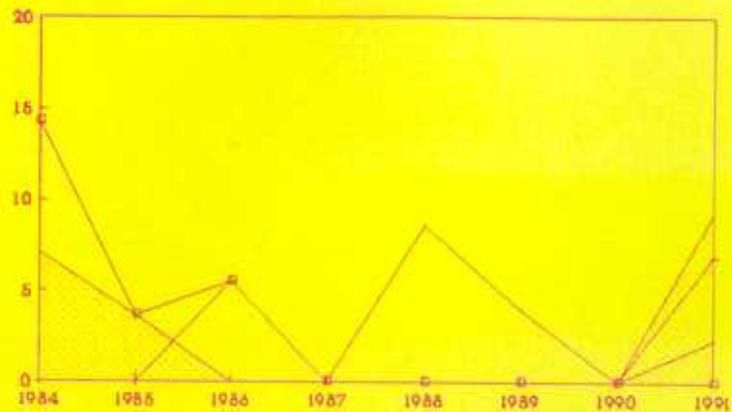


FIGURA 9.- DISTRIBUCION ANUAL DE SEROVARIEDADES EN CEPAS DE SEROTIPO IB

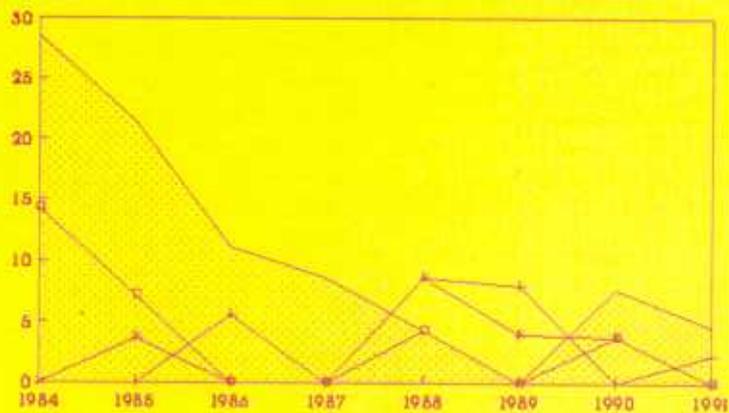




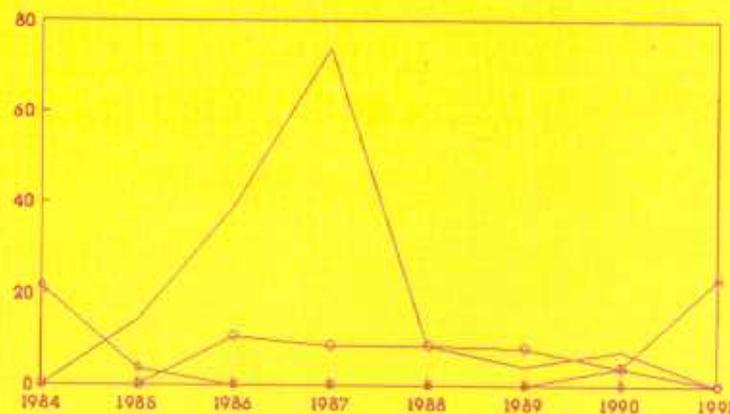
— opi + opvt —□— opyt □ opyl

— opyvt + oya + pyust □ pyvvt

FIGURA 10.- DISTRIBUCION ANUAL DE LAS PRINCIPALES SEROVARIEDADES DE CEPAS NGPP SEROTIPO IB



+ pyvt + rop □ ropi —□— ropyt



+ ys + rpyat —□— x □ x/v

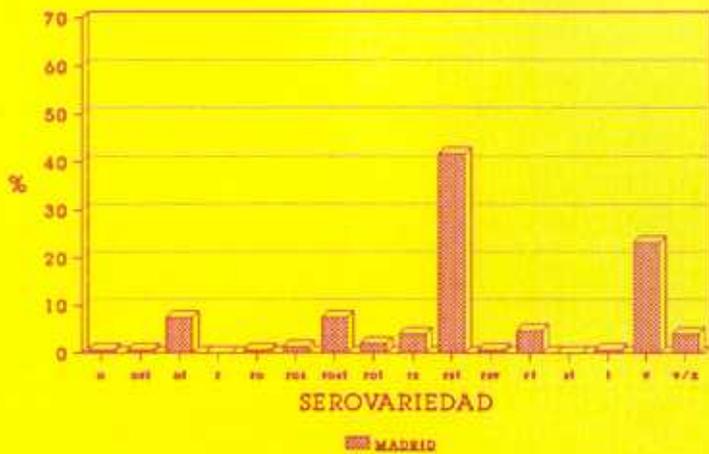
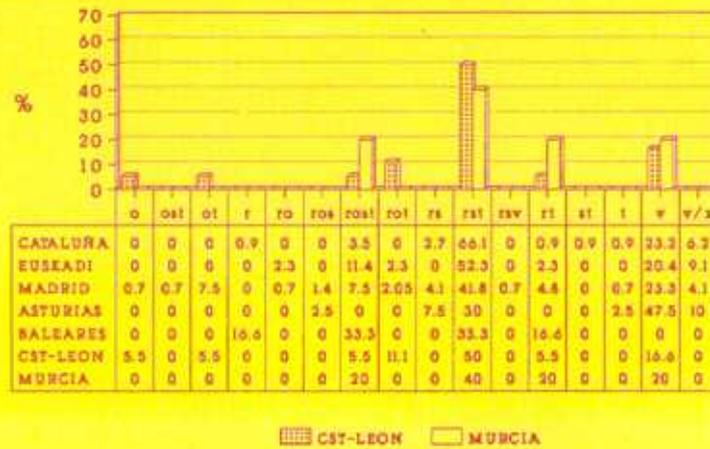
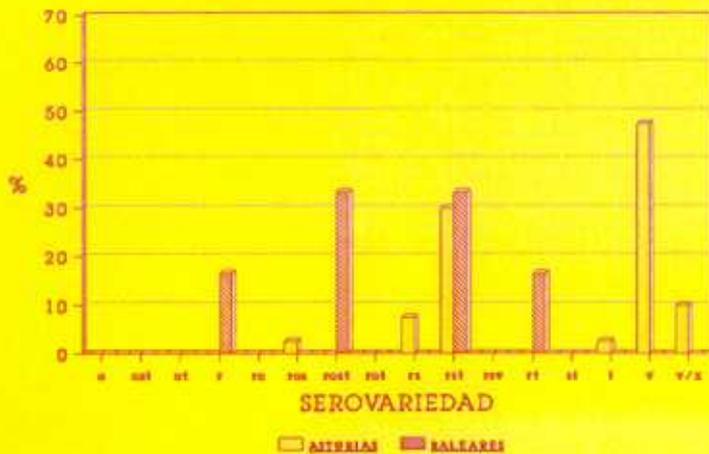
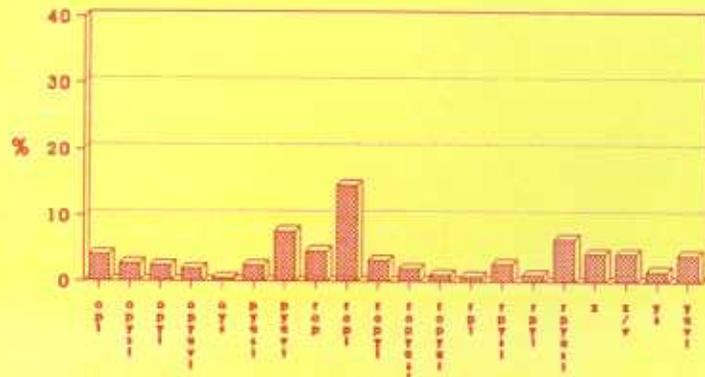


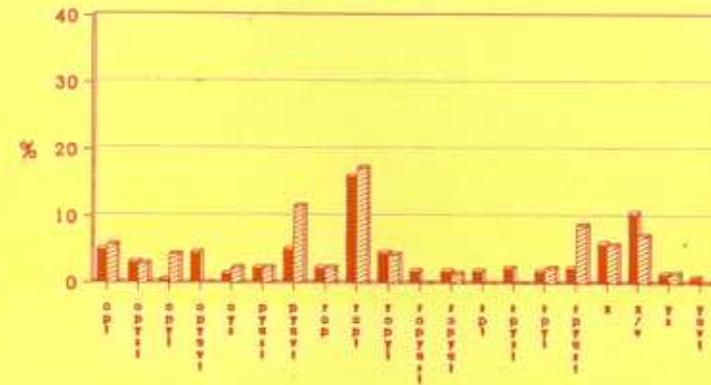
FIGURA II.- DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE SEROTIPIIDADES EN CEPAS IA





SEROVARIEDADES

MADRID



3. AUXOTIPIA

3.1 Distribución global de auxotipos

Los auxotipos más frecuentes que hemos encontrado en el total de la población estudiada se reflejan en la Figura 13.

Los dos auxotipos más abundantes, han sido el Prototrófico y el Pro⁻ (cepas que requieren prolina para su crecimiento). El resto de auxotipos se han obtenido en mucha menor proporción.

3.2 Distribución anual de auxotipos

En la Figura 14 se puede observar la distribución anual de auxotipos.

Los auxotipos más frecuentes en cada año del estudio han sido también el Prototrófico y el prolina dependiente. Hay que mencionar el incremento paulatino que se produce del auxotipo Pro⁻, Arg⁻ (prolina, arginina dependiente).

3.3 Distribución geográfica

En la Figura 15 se refleja la distribución geográfica de las cepas Prototróficas y prolina dependiente.

Baleares y Asturias son las Comunidades Autónomas que presentan un mayor porcentaje de cepas Prototróficas, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) con el resto de las Comunidades.

La frecuencia de estos dos auxotipos en Madrid no es diferente estadísticamente de las demás Comunidades, excepto de Cataluña con la que presenta diferencias significativas ($p < 0.01$).

FIGURA 13.- DISTRIBUCION DE AUXOTIPOS EN EL TOTAL DE LA POBLACION

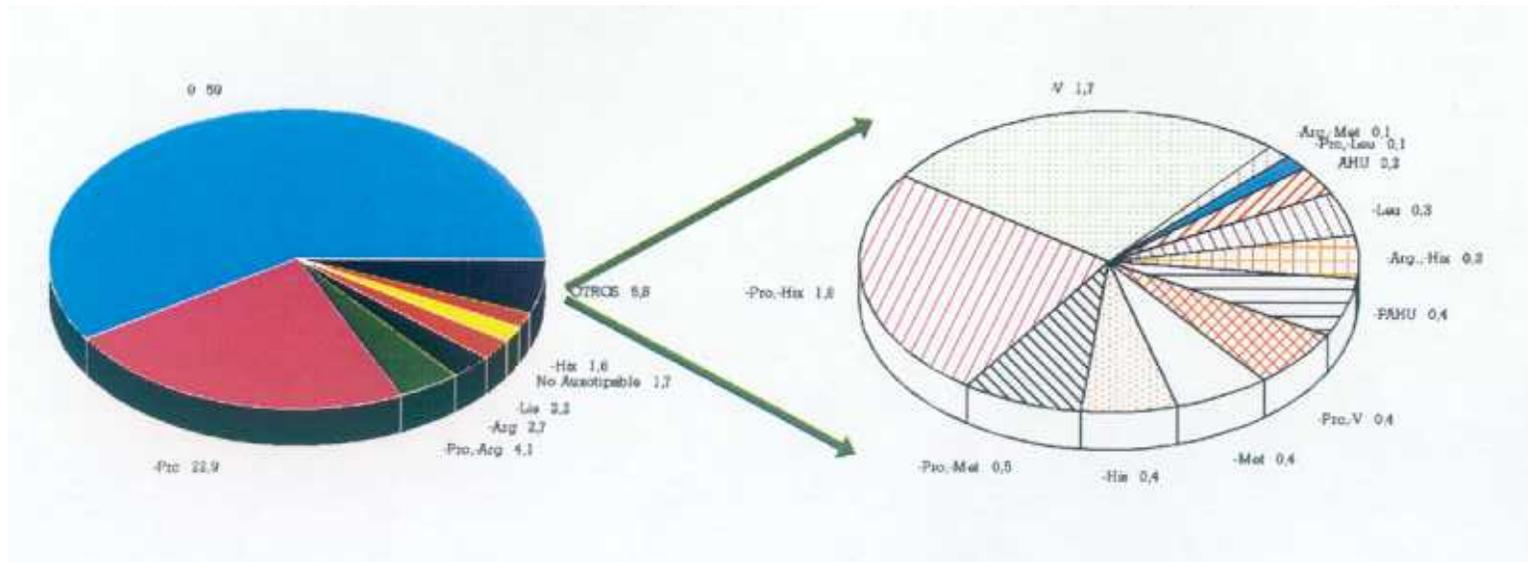
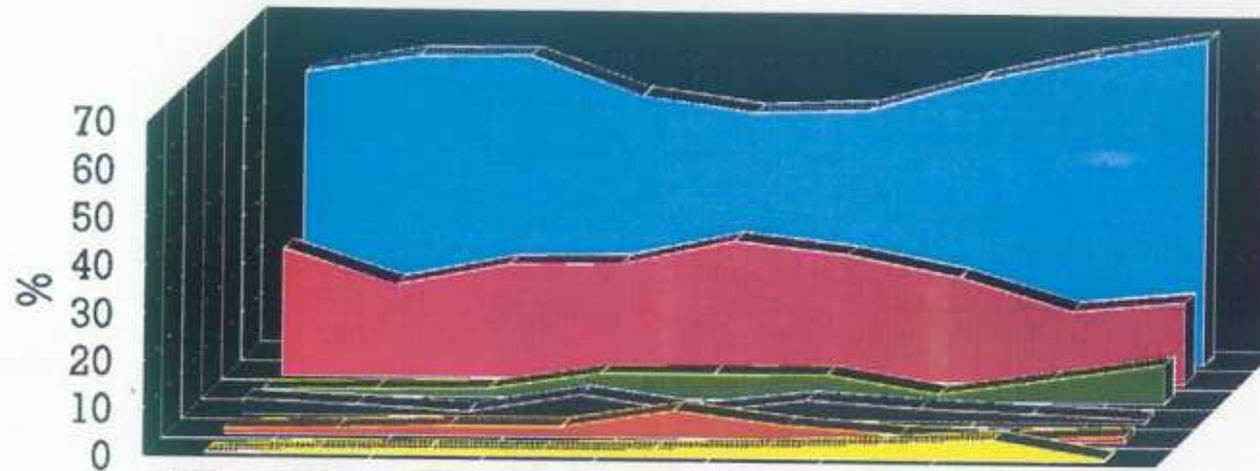


FIGURA 14.- DISTRIBUCION ANUAL DE AUXOTIPOS

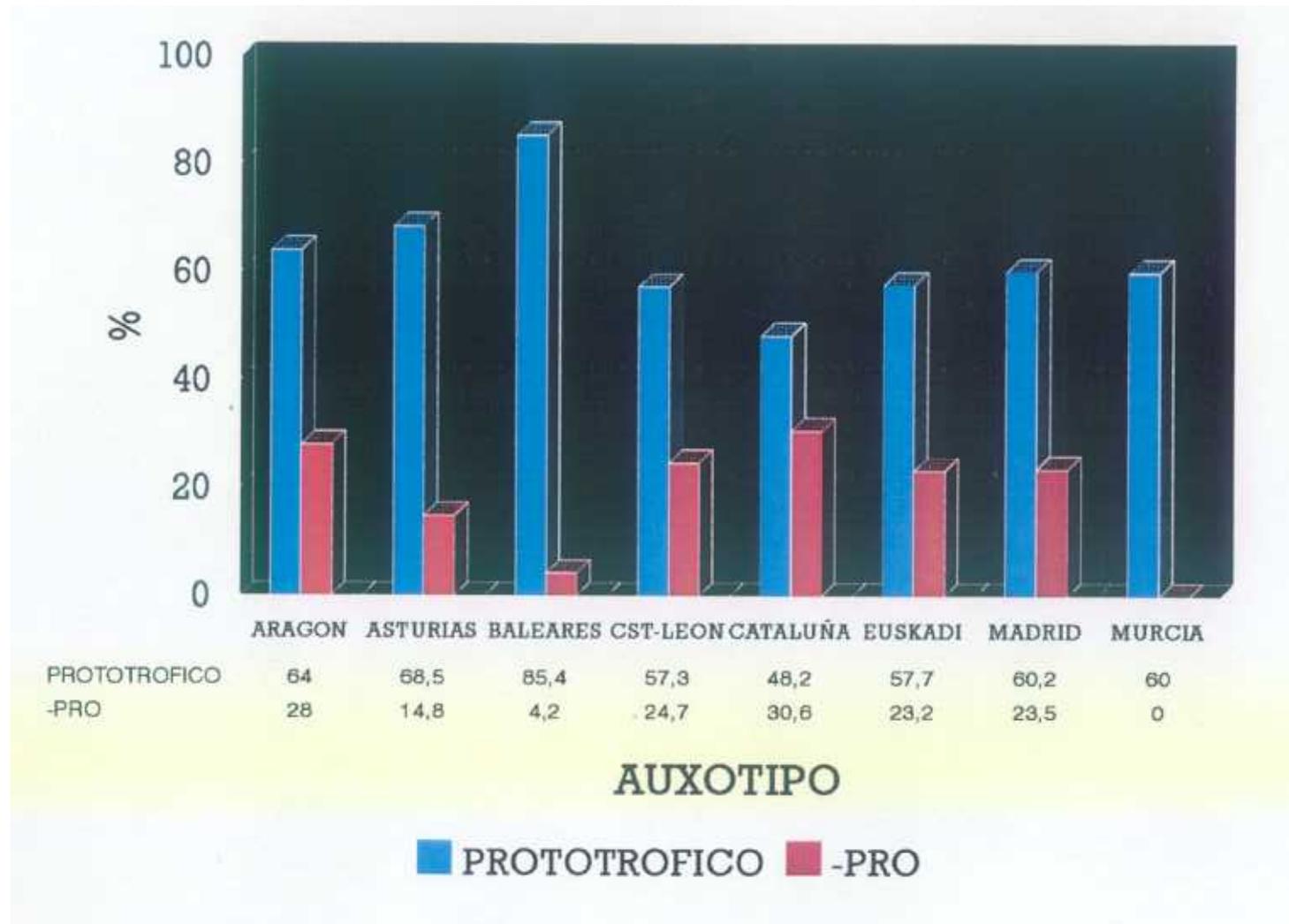


0	59,6	63,2	63,5	55,2	51,9	52,7	59,2	64,2	68
-PRO	26,6	19,3	23,8	24,1	29,1	26,5	22	15,2	17,3
-PRO,-ARG	1,1	1,4	1,8	5,1	5,2	5,4	1,6	4,8	8,2
-ARG	3,2	2,3	1,1	4,8	1,5	4,1	2,7	1,7	0,9
-LIS	1,1	1,4	2,1	2,1	5,6	2,8	1,2	0,4	1,4
NO AUXOTIPABLES	0	0,9	1,1	1,1	1,5	2,2	3,1	4,3	0,5

AÑO

■ NO AUXOTIPABLES
 ■ -LIS
 ■ -ARG
 ■ -PRO,-ARG
 ■ -PRO
 ■ 0

**FIGURA 15.- DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE
CEPAS PROTOTROFICAS Y -PROLINA**



4. ANALISIS DE PLASMIDOS EN CEPAS PRODUCTORAS DE PENICILINASA

4.1 Distribución temporal de los diferentes perfiles plasmídicos

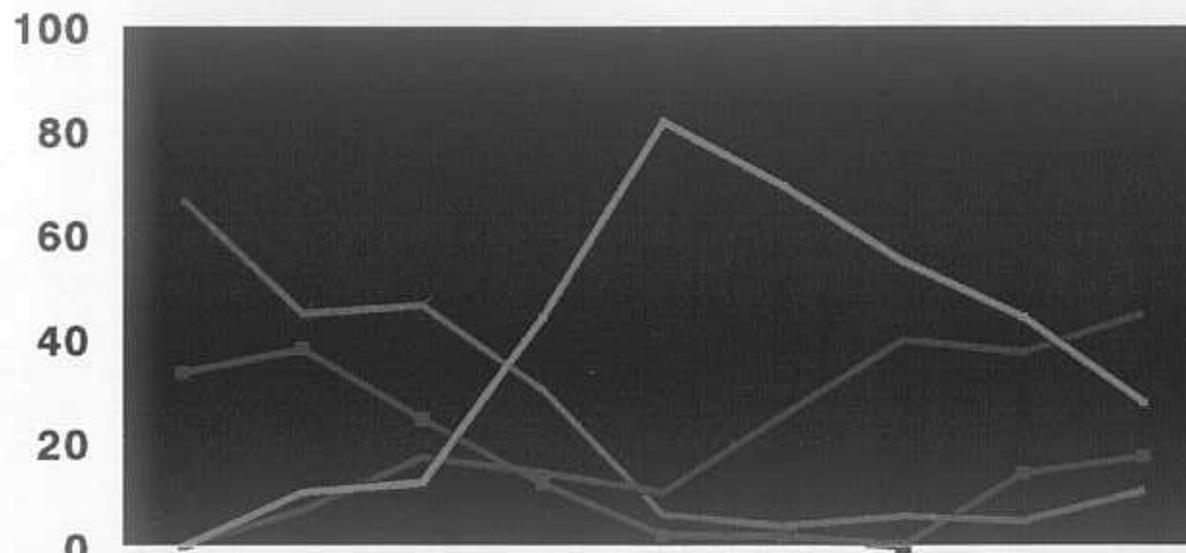
En la Figura 16 se puede observar la incidencia anual de perfiles plasmídicos en las 399 cepas productoras de β -lactamasa.

Hasta 1986 el plásmido de 4.5 Md, con o sin plásmido de transferencia, ha sido el más frecuente, a partir de ese año se produce un cambio en el perfil plasmídico, siendo más abundante el de 3.2 Md, situación que se mantiene hasta la actualidad, si bien hay una tendencia a que se equilibre la frecuencia de estos dos tipos de plásmidos.

En la Figura 17 se refleja la relación de la sensibilidad a tetraciclina en función de la variación plasmídica.

Hay que destacar que el aumento de cepas resistentes a tetraciclina coincide con una mayor presencia del plásmido de 4.5 Md y un descenso del de 3.2 Md; produciéndose el proceso contrario en los años en que el número de cepas resistentes a tetraciclina disminuye.

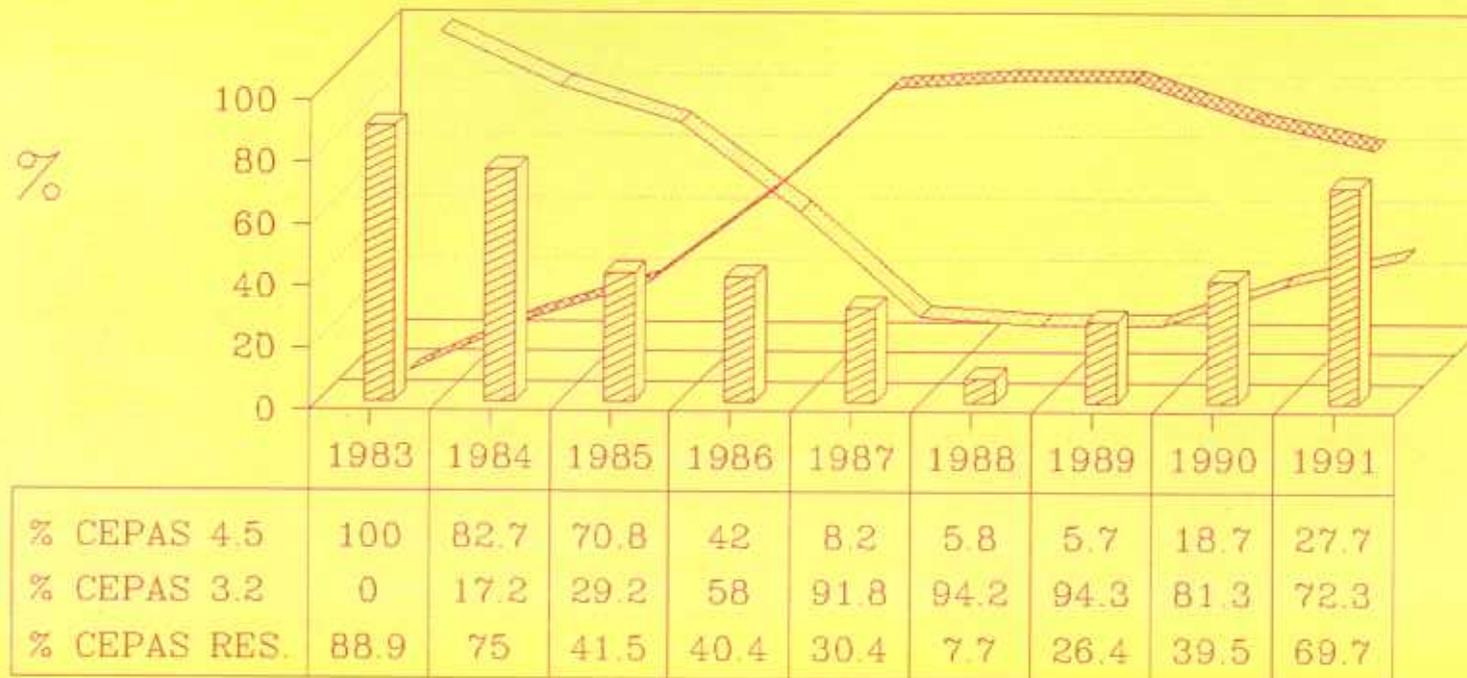
FIGURA 16.- INCIDENCIA ANUAL DE PERFILES PLASMIDICOS EN CEPAS NGPP



	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991
3.2 Md	0	10,3	12,2	44	81,6	69,2	54,7	44,1	27,6
3.2 + 24.5 Md	0	6,9	17	14	10,2	25	39,6	37,2	44,7
4.5 Md	66,6	44,8	46,3	30	6,1	3,8	5,7	4,8	10,6
4.5 + 24.5 Md	33,3	37,9	24,4	12	2	1,9	0	13,9	17,1

→ 3.2 Md + 3.2 + 24.5 Md * 4.5 Md ■ 4.5 + 24.5 Md

FIGURA 17.- RELACION DE SENSIBILIDAD A TETRACICLINA Y LA VARIACION PLASMIDICA



ANO

 % CEPAS RES.
  % CEPAS 3.2
  % CEPAS 4.5

5. ANALISIS MULTIENTZIMATICO

5.1 Estudio inter-específico en el género *Neisseria*

Hemos estudiado 117 cepas de diferentes especies del género *Neisseria*, las cuales se han agrupado en 89 Tipos Electroforéticos (TEs) diferentes. Las especies que forman cada TE quedan reflejadas en la Figura 18; por otro lado, el perfil de alelos obtenidos para los 9 enzimas ensayados se presenta en la Tabla XVIII.

Las 9 enzimas incluidas en el estudio resultaron ser polimórficas para el conjunto de las especies estudiadas (Ver Apéndice). Sin embargo enzimas como la Malato deshidrogenasa y la Alcohol deshidrogenasa fueron monomórficas para las especies *N. polysaccharea*, *N. lactamica*, *N. cinerea*, *N. gonorrhoeae*, *N. cuniculi* y *N. meningitidis*. Estas enzimas también fueron monomórficas en las cepas de las especies *N. perflava/sicca*, *N. flava*, *N. subflava* y *N. elongata*, aunque con un perfil alélico distinto.

Las cepas de *N. mucosa* presentaban polimorfismo para las enzimas Malato deshidrogenasa y Alcohol deshidrogenasa.

Los TEs que hemos encontrado dentro de cada especie no se vuelven a encontrar en otras especies del género.

TABLA XVIII. PERFIL DE ALELOS EN 117 CEPAS DEL GENERO *NEISSERIA* PARA LAS 9 ENZIMAS ESTUDIADAS

<u>TE</u>	<u>TOTAL</u>	<u>G6P</u>	<u>ME</u>	<u>GOT</u>	<u>ALP</u>	<u>GD1</u>	<u>GD2</u>	<u>IDH</u>	<u>MDH</u>	<u>ADH</u>
1	1	5	4	3	5	1	3	3	1	1
2	1	5	4	3	5	1	2	3	1	1
3	2	5	4	4	5	1	3	3	1	1
4	2	5	4	4	5	1	3	4	1	1
5	5	5	4	6	5	1	3	5	1	1
6	1	4	4	7	5	1	3	5	1	1
7	1	5	4	4	5	1	2	4	1	1
8	1	5	4	4	5	1	2	5	1	1
9	1	4	4	4	5	1	2	5	1	1
10	1	6	4	4	5	1	2	4	1	1
11	1	6	4	4	5	1	3	4	1	1
12	1	5	4	4	6	1	2	4	1	1
13	2	5	3	6	5	1	2	4	1	1
14	1	5	3	6	5	1	2	5	1	1
15	1	5	3	6	5	2	2	5	1	1
16	1	6	3	6	5	1	3	4	1	1
17	1	4	5	4	3	2	2	3	1	1
18	1	4	5	4	5	2	2	3	1	1
19	1	3	5	4	3	1	2	3	1	1
20	1	4	5	2	5	1	3	3	1	1
21	1	3	5	6	5	2	3	3	1	1
22	1	3	5	6	5	2	2	3	1	1
23	2	5	5	5	5	2	2	3	1	1
24	1	5	5	6	5	2	2	3	1	1
25	1	5	5	6	4	2	3	3	1	1
26	1	5	3	6	5	2	3	3	1	1
27	1	5	5	2	4	2	2	3	1	1
28	1	5	5	2	6	2	2	3	1	1
29	1	5	5	3	6	2	2	3	1	1
30	2	3	4	6	3	2	2	4	1	1
31	1	3	4	6	4	2	2	4	1	1
32	1	3	4	6	4	2	2	3	1	1
33	2	3	4	6	4	2	3	3	1	1
34	1	3	4	6	3	2	3	2	1	1
35	1	3	4	2	3	2	3	2	1	1
36	3	3	4	3	2	2	3	4	1	1
37	1	3	4	3	2	2	3	2	1	1
38	1	3	4	3	4	1	2	2	1	1
39	1	3	4	4	4	1	2	2	1	1
40	1	3	4	4	4	2	2	2	1	1
41	1	5	4	4	2	2	2	2	1	1
42	2	3	3	4	3	2	3	5	1	1
43	1	4	3	4	3	1	3	5	1	1
44	1	4	3	4	3	1	2	2	1	1
45	1	4	3	4	5	1	3	2	1	1

<u>TE</u>	<u>TOTAL</u>	<u>G6P</u>	<u>ME</u>	<u>GOT</u>	<u>ALP</u>	<u>GD1</u>	<u>GD2</u>	<u>IDH</u>	<u>MDH</u>	<u>ADH</u>
46	1	4	3	6	4	1	3	2	1	1
47	1	3	5	3	3	1	3	4	1	1
48	1	4	3	3	3	1	3	4	1	1
49	2	4	4	3	3	2	3	4	1	1
50	2	4	4	6	4	1	2	2	1	1
51	1	4	4	6	4	1	2	4	1	1
52	1	4	4	5	4	1	3	4	1	1
53	1	4	4	5	5	2	3	2	1	1
54	4	4	3	6	4	0	3	3	1	1
55	3	4	3	6	4	0	3	4	1	1
56	5	4	3	5	4	0	3	4	1	1
57	2	3	3	5	4	0	3	3	1	1
58	3	4	3	5	4	0	4	2	1	1
59	1	4	3	5	4	0	4	4	1	1
60	1	4	3	6	4	0	4	2	1	1
61	1	4	3	6	5	0	4	2	1	1
62	1	5	3	5	1	2	2	3	4	4
63	1	5	3	5	1	2	3	3	4	4
64	2	5	4	5	1	2	3	3	4	4
65	2	5	4	4	3	2	3	4	4	4
66	1	5	4	7	3	2	2	4	4	4
67	1	2	4	7	4	2	3	5	4	4
68	1	3	4	1	4	3	3	5	4	4
69	1	3	3	4	5	2	2	5	4	4
70	1	3	3	6	3	2	2	5	4	4
71	1	1	2	2	6	2	2	5	4	4
72	1	3	5	6	4	1	2	5	4	4
73	1	5	5	7	7	1	2	5	4	4
74	1	4	2	7	5	1	2	5	4	4
75	1	2	2	5	6	1	2	5	4	4
76	1	2	1	5	6	1	2	5	4	4
77	1	1	1	8	5	1	2	4	4	4
78	1	1	1	5	2	2	5	1	4	4
79	1	2	2	6	2	2	3	4	4	4
80	1	2	0	4	7	2	2	4	4	4
81	1	4	5	4	2	2	1	4	4	4
82	2	3	6	4	7	1	3	6	4	4
83	1	3	3	0	0	1	3	2	4	4
84	1	3	4	0	7	5	2	6	5	5
85	1	3	1	5	3	1	1	4	3	3
86	1	2	1	5	1	1	3	4	3	3
87	1	2	2	0	2	1	5	2	3	3
88	1	2	1	5	7	2	2	5	2	2
89	1	2	2	5	7	2	3	4	2	2

5.1.1 Diversidad genética

En la Tabla XIX se incluyen los valores de la diversidad genética (h) encontrados dentro de las especies *N. polysaccharea* y *N. lactamica*.

Hemos obtenido 12 TEs de las 19 cepas de *N. polysaccharea* empleadas en el estudio. La proporción de alelos por locus fue de 1.8. La diversidad genética media (H) entre TEs ha sido de 0.31.

Todas las enzimas ensayadas han sido polimórficas, con un número de alelos que varia de 2 a 3, excepto la Malato deshidrogenasa (MDH), Alcohol deshidrogenasa (ADH) y la Fosfatasa alcalina (ALP) que fueron monomórficas.

Las 20 cepas de la especie *N. lactamica* se agrupan en 18 TEs. La proporción de alelos por enzima ha sido de 2.3. La diversidad genética media entre los TEs fue de 0.44.

A excepción de las enzimas Malato deshidrogenasa y Alcohol deshidrogenasa el resto fueron polimórficas.

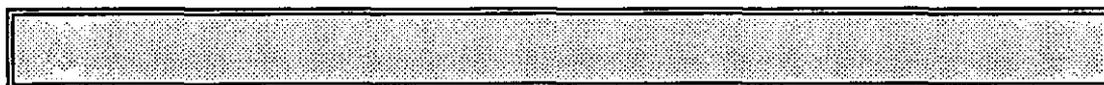
En la Tabla XX se pueden observar los valores de la diversidad genética obtenida en *N. meningitidis* y *N. cinerea*.

Hemos encontrado 16 TEs de las 19 cepas de meningococo estudiadas. La proporción de alelos por locus ha sido de 2.7. La diversidad genética media entre TEs fue de 0.46. Excepto las enzimas ADH y MDH el resto fueron polimórficas con un número de alelos que oscilaba de 2 a 6.

TABLA XIX. DIERSIDAD GENETICA DE LAS 9 ENZIMAS ESTUDIADAS EN
N. POLYSACCHAREA Y *N. LACTAMICA*

N. polysaccharea

<u>ENZIMA</u>	<u>N° ALELOS</u>	<u>h TEs</u>
G6P	2	0.3
ME	2	0.4
GOT	3	0.67
ALP	1	0
GD1	2	0.18
GD2	2	0.54
IDH	3	0.71
MDH	1	0
ADH	1	0
<hr/>		
MEDIA	1.8	0.31



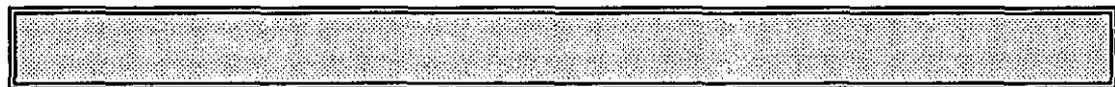
N. lactamica

<u>ENZIMA</u>	<u>N° ALELOS</u>	<u>h TEs</u>
G6P	2	0.5
ME	3	0.52
GOT	3	0.6
ALP	3	0.58
GD1	2	0.53
GD2	2	0.47
IDH	4	0.78
MDH	1	0
ADH	1	0
<hr/>		
MEDIA	2.3	0.44

TABLA XX. DIVERSIDAD GENETICA DE LAS 9 ENZIMAS ESTUDIADAS EN *N. MENINGITIDIS* Y *N. CINEREA*

N. meningitidis

<u>ENZIMA</u>	<u>Nº ALELOS</u>	<u>h TEs</u>
G6P	3	0.7
ME	3	0.57
GOT	5	0.81
ALP	5	0.77
GD1	2	0.23
GD2	2	0.49
IDH	3	0.57
MDH	1	0
ADH	1	0
<hr/>		
MEDIA	2.7	0.46



N. cinerea

<u>ENZIMA</u>	<u>Nº ALELOS</u>	<u>h TEs</u>
G6P	3	0.71
ME	3	0.71
GOT	2	0.58
ALP	4	0.78
GD1	2	0.52
GD2	2	0.58
IDH	3	0.71
MDH	1	0
ADH	1	0
<hr/>		
MEDIA	2.3	0.51

Las 7 cepas de *N. cinerea* se agruparon en 6 TEs diferentes. La proporción de alelos por enzima fue de 2.3. La diversidad genética media entre TEs ha sido de 0.51.

Menos las enzimas ADH y MDH, el resto fueron polimórficas con un número de alelos que variaba de 2 a 3.

En la Tabla XXI se incluyen los valores de la diversidad genética obtenidos dentro de las especies *N. perflava/sicca* y *N. mucosa*.

Hemos encontrado 15 TEs diferentes en las 18 cepas de *N. perflava/sicca*. La proporción de alelos por locus ha sido de 4.2. La diversidad genética media entre TEs fue de 0.6.

Las enzimas ADH y MDH fueron monomórficas con un alelo diferente que el que hemos encontrado para estas enzimas en las especies mencionadas anteriormente, el resto de las enzimas fueron polimórficas con un número de alelos que variaba de 2 a 7.

Las 7 cepas de *N. mucosa* se agruparon en 7 TEs distintos. La proporción de alelos por locus ha sido de 3.1. La diversidad genética media entre TEs fue de 0.67.

Todas las enzimas ensayadas resultaron ser polimórficas con un número de alelos que varía de 2 a 5.

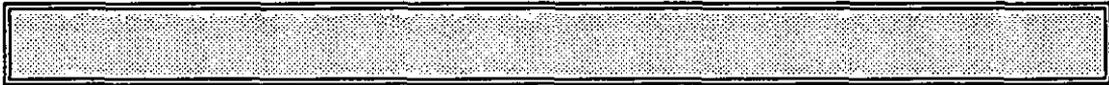
En la Tabla XXII se pueden observar los valores de la diversidad genética encontrados dentro de la especie *N. gonorrhoeae*.

Hemos obtenido 8 TES diferentes de las 20 cepas de gonococo incluidas en el estudio. La proporción de alelos por locus ha sido de 1.5. La diversidad genética media entre TEs ha sido de 0.26.

TABLA XXI. DIVERSIDAD GENETICA DE LAS 9 ENZIMAS ESTUDIADAS EN *N. PERFLAVA/SICCA* Y *N. MUCOSA*

N. perflava/sicca

<u>ENZIMA</u>	<u>Nº ALELOS</u>	<u>h TEs</u>
G6P	5	0.83
ME	6	0.85
GOT	7	0.88
ALP	7	0.89
GD1	3	0.58
GD2	3	0.59
IDH	5	0.70
MDH	1	0
ADH	1	0
<hr/>		
MEDIA	4.2	0.60



N. mucosa

<u>ENZIMA</u>	<u>Nº ALELOS</u>	<u>h TEs</u>
G6P	2	0.48
ME	4	0.71
GOT	3	0.53
ALP	5	0.86
GD1	2	0.58
GD2	3	0.72
IDH	3	0.66
MDH	3	0.77
ADH	3	0.77
<hr/>		
MEDIA	3.1	0.67

TABLA XXII. DIVERSIDAD GENETICA DE LAS 9 ENZIMAS ESTUDIADAS EN *N. GONORRHOEAE**N. gonorrhoeae*

<u>ENZIMA</u>	<u>N° ALELOS</u>	<u>h TEs</u>
G6P	2	0.25
ME	1	0
GOT	2	0.57
ALP	2	0.25
GD1	1	0
GD2	2	0.57
IDH	3	0.74
MDH	1	0
ADH	1	0
<hr/>		
MEDIA	1.5	0.26

De las 9 enzimas estudiadas la Malato deshidrogenasa, Alcohol deshidrogenasa y Enzima málico resultaron ser monomórficas; el resto fueron polimórficas con un número de alelos que oscilaba de 2 a 3.

Ninguna de las cepas de *N. gonorrhoeae* presentaba actividad de la enzima Glutámico deshidrogenasa NADP dependiente (GD2).

En la Tabla XXIII se reflejan los resultados de la diversidad genética encontrada entre las especies del género *Neisseria*.

Hemos encontrado 89 TEs distintos de las 117 cepas estudiadas que pertenecían a las distintas especies del género *Neisseria* descritas anteriormente en el apartado 1 de Material y Métodos. La proporción de alelos por enzima ha sido de 6.2. La diversidad genética media entre los distintos TEs fue de 0.67 y entre los aislados de 0.65.

Todas las enzimas estudiadas han sido polimórficas con un número de alelos que variaba de 5 a 9.

El número de cepas que no presentaban actividad de algún enzima ha sido pequeño; 3 cepas de *N. mucosa* de las cuales 2 no exhibían actividad de la enzima Glutámico oxalacético transaminasa (GOT) y Fosfatasa alcalina (ALP) y 1 negativa para el Enzima málico (ME), *N. denitrificans* y *N. macacae* no presentaban actividad de la enzima GOT, así mismo como hemos dicho anteriormente las 20 cepas de gonococo estudiadas no tenían actividad de la enzima GD2.

TABLA XXIII. DIVERSIDAD GENETICA DE LAS 9 ENZIMAS ESTUDIADAS EN LAS ESPECIES DEL GENERO *NEISSERIA*

<u>ENZIMA</u>	<u>N° ALELOS</u>	<u>h_TEs</u>	<u>h aislados</u>
G6P	6	0.76	0.76
ME	7	0.74	0.71
GOT	9	0.81	0.80
ALP	8	0.80	0.77
GD1	5	0.60	0.66
GD2	5	0.59	0.59
IDH	6	0.76	0.77
MDH	5	0.47	0.43
ADH	5	0.47	0.43
<hr/>			
MEDIA	6.2	0.67	0.65

5.1.2 Relaciones genéticas entre las diferentes especies

Las relaciones genéticas entre las diferentes especies del género *Neisseria* se pueden observar en la Figura 18 que corresponde al dendrograma generado a partir de la matriz de distancias genéticas. Los TEs se han numerado secuencialmente en el mismo orden de la Tabla XVIII. Los TEs constituidos por una sola cepa se han representado por una línea, mientras que los TEs formados por más de una cepa se indican con triángulos, cuyo tamaño es proporcional al número de cepas. Así mismo cada especie se ha designado por una clave gráfica con el fin de poder ser fácilmente identificada en el dendrograma.

Existen dos "clusters" mayoritarios, uno representado por los TEs 1 al 61 ("cluster" I) y otro del 62 al 89 ("cluster" II), relacionados a una distancia genética de 0.85.

El "cluster" I está formado por las siguientes especies: *N. polysaccharea*, *N. cuniculi*, *N. lactamica*, *N. cinerea*, *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*, el "cluster" II por *N. perflava/sicca*, *N. flava*, *N. mucosa*, *N. subflava*, *N. elongata*, *N. denitrificans* y *N. macacae*.

El "cluster" I a su vez está formado por los "clusters" a,b,c,d y e.

El "cluster" a incluye 16 TEs (1-16), de los cuales 12 corresponden al total de cepas de *N. polysaccharea*, 1 formado por *N. cuniculi*, 2 por *N. cinerea* y 1 por *N. lactamica* a una distancia genética de 0.42.

El "cluster" b comprende 13 TEs (17-29), en los que se incluyen 10 TEs formados por cepas de *N. meningitidis*, 1 por *N. lactamica* y 1 por *N. cinerea* a una distancia genética de 0.42.

El "cluster" c agrupa 12 TEs (30-41), en el que se incluyen 7 TEs formados por *N. lactamica*, 3 por *N. meningitidis* y 2 por *N. cinerea* a una distancia genética de 0.5.

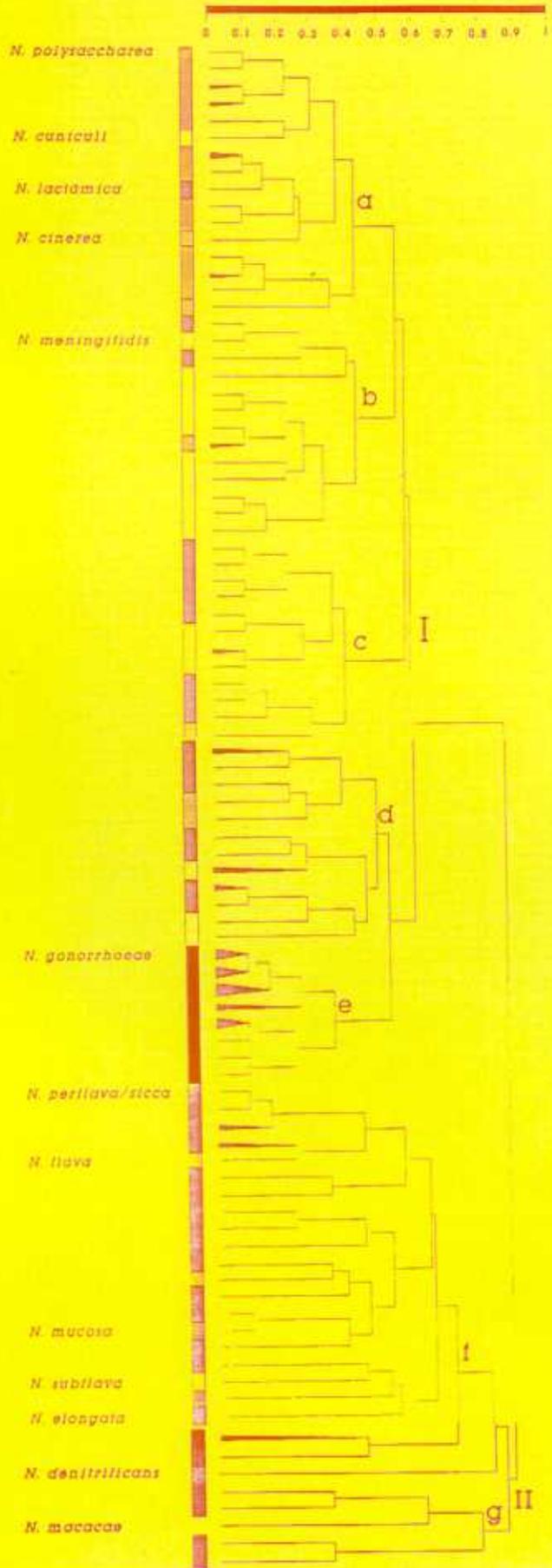
El "cluster" e es constituido por 8 TEs (54-61) integrado exclusivamente por cepas de *N. gonorrhoeae*.

El "cluster" II a su vez está formado por dos "clusters" f y g.

El "cluster" f agrupa 23 TEs (62-84), formado por 15 TEs de *N. perflava/sicca*, 2 de *N. flava*, 3 de *N. mucosa*, 1 de *N. subflava*, 1 de *N. elongata* y 1 de *N. denitrificans* a una distancia genética de 0.8.

En el "cluster" g se incluyen 5 TEs (85-89), formado por 4 TEs integrados por cepas de *N. mucosa* y 1 por *N. macacae* a una distancia genética de 0.85.

FIGURA 18.- RELACIONES GENÉTICAS ENTRE 89 TES OBTENIDOS EN 117 CEPAS DEL GÉNERO *NEISSERIA*



5.2 Aplicación de isoenzimas en *N. gonorrhoeae*

5.2.1 Análisis multienzimático en cepas con resistencia cromosómica

Hemos incluido 354 cepas de *N. gonorrhoeae* no productoras de penicilinas y con diferentes niveles de sensibilidad a penicilina las cuales se han agrupado en 46 TEs diferentes. Las características de las cepas que constituyen cada TE, en cuanto a los serotipos encontrados así como los niveles de resistencia a penicilina y tetraciclina que presentan se pueden observar en la Figura 19. El perfil de alelos obtenido para las 12 enzimas ensayadas se presenta en la Tabla XXIV.

Las 12 enzimas incluidas en el estudio son:

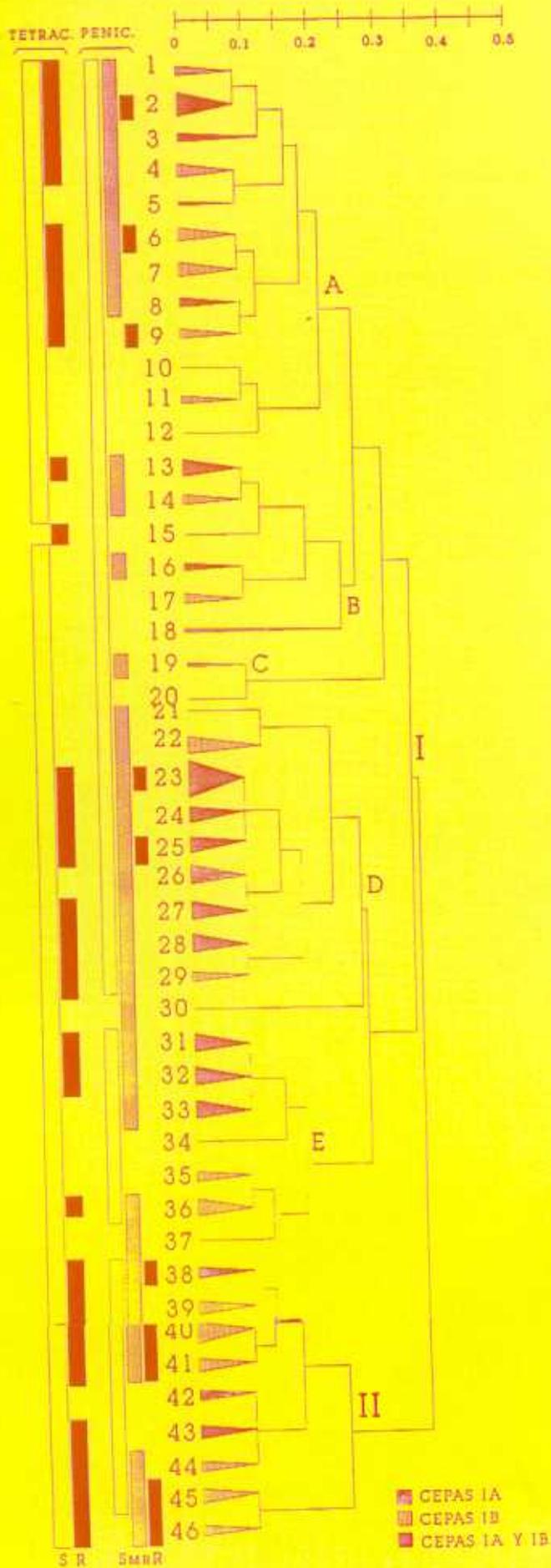
Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6P)
Enzima málico (ME)
Glutámico oxalacético Transaminasa (GOT)
Fosfatasa alcalina (ALP)
Glutamato deshidrogenasa NADP dependiente (GD2)
Isocitrato deshidrogenasa (IDH)
Malato deshidrogenasa (MDH)
Alcohol deshidrogenasa (ADH)
6 Fosfogluconato deshidrogenasa (6PG)
Leucina aminopeptidasa (LAP)
Fosfoglucomutasa (PGM)
Fosfogucosa isomerasa (PGI)

De estas 12 enzimas ensayadas 9 resultaron ser polimórficas y 3 (6PG, MDH y ADH) fueron monomórficas.

TABLA XXIV. PERFIL DE ALELOS EN CEPAS NO-NGPP PARA LAS 12 ENZIMAS ESTUDIADOS

<u>TE</u>	<u>TOI</u>	<u>G6P</u>	<u>ME</u>	<u>GOT</u>	<u>ALP</u>	<u>GD2</u>	<u>IDH</u>	<u>MDH</u>	<u>ADH</u>	<u>6PG</u>	<u>LAP</u>	<u>PGM</u>	<u>PGI</u>
1	4	2	1	2	2	1	2	1	1	1	3	2	2
2	4	2	2	2	2	1	2	1	1	1	3	2	2
3	20	2	2	2	2	1	1	1	1	1	3	2	2
4	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	1	2	2
5	3	2	2	2	2	1	3	1	1	1	1	2	2
6	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	2
7	14	2	2	2	2	2	1	1	1	1	3	2	2
8	4	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2
9	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2
10	5	2	2	2	3	2	2	1	1	1	3	2	2
11	3	2	2	2	3	1	2	1	1	1	3	2	2
12	2	2	2	2	3	2	2	1	1	1	1	2	2
13	1	2	2	2	2	1	3	1	1	1	3	2	2
14	8	2	2	2	2	2	3	1	1	1	3	2	2
15	5	2	2	3	2	2	3	1	1	1	3	2	2
16	10	1	2	2	2	2	3	1	1	1	3	2	2
17	1	1	2	2	2	2	3	1	1	1	2	2	2
18	38	2	2	2	1	1	3	1	1	1	3	2	2
19	25	2	2	2	2	1	2	1	1	1	3	2	1
20	11	2	2	2	2	1	2	1	1	1	3	1	1
21	38	2	2	1	2	1	1	1	1	1	2	1	2
22	6	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2	1	2
23	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2	2	2
24	8	2	2	2	2	1	3	1	1	1	2	2	2
25	14	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2
26	10	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2
27	1	2	2	2	2	2	3	1	1	1	2	2	2
28	1	2	2	1	2	1	2	1	1	1	2	2	2
29	8	2	2	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2
30	5	2	2	3	3	1	2	1	1	1	2	2	2
31	3	1	2	2	2	1	2	1	1	1	2	2	2
32	1	1	2	2	2	1	2	1	1	1	3	2	2
33	15	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	2	2
34	12	1	2	3	2	1	2	1	1	1	2	2	2
35	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2
36	7	1	2	2	2	1	3	1	1	1	2	2	2
37	4	1	2	1	2	1	3	1	1	1	2	2	2
38	4	2	1	1	2	1	1	1	1	1	2	2	2
39	15	2	1	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2
40	1	2	1	2	2	1	2	1	1	1	2	2	2
41	2	2	1	2	2	1	3	1	1	1	2	2	2
42	7	1	1	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2
43	2	1	1	2	2	1	3	1	1	1	2	2	2
44	6	1	1	2	2	1	2	1	1	1	2	2	2
45	4	2	1	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2
46	13	2	1	2	2	2	1	1	1	1	3	2	2

FIGURA 19.- RELACIONES GENÉTICAS ENTRE 46 TEs
OBTENIDOS EN 354 CEPAS DE NEISSERIA GONORRHOEAE



5.2.1.1 Diversidad genética

En la Tabla XXV se presentan los valores de la diversidad genética (h) encontrados en las 354 cepas de gonococo estudiadas.

Las enzimas que resultaron ser polimórficas han presentado un número de alelos que variaba de 2 a 3. La proporción de alelos por enzima ha sido de 2.07. La diversidad genética media (H) entre TEs fue de 0.26 y entre aislados de 0.27.

5.2.1.2 Relaciones genéticas entre los distintos genotipos

En la Figura 19 se pueden observar las relaciones genéticas entre las cepas de gonococo estudiadas expresadas a través de un dendrograma generado a partir de una matriz de distancias genéticas. Los TEs se han numerado en el mismo orden que aparecen en la Tabla XXV. Los TEs formados por una sola cepa se han representado por una línea, mientras que aquellos que están constituidos por más de una cepa se indican con triángulos, cuyo tamaño es proporcional al número de cepas. Se han empleado claves gráficas para explicar la composición de serotipos de cada TE así como la distribución de sensibilidad a penicilina y tetraciclina en los mismos.

Se han encontrado 2 "clusters" mayoritarios uno representado por los TEs 1 al 37 ("cluster" I) y otro del 38 al 46 ("cluster" II), relacionados a una distancia genética de 0.35.

TABLA XXV. DIVERSIDAD GENETICA EN CEPAS NO-NGPP

<u>ENZIMA</u>	<u>ALELOS</u>	<u>h TEs</u>	<u>h aislados</u>
GEP	2	0.4	0.32
ME	2	0.35	0.27
GOT	3	0.31	0.37
ALP	3	0.2	0.26
GD2	2	0.45	0.37
IDH	3	0.64	0.66
MDH	1	0	0
ADH	1	0	0
6PG	1	0	0
LAP	3	0.60	0.57
PGM	2	0.13	0.27
PGI	2	0.09	0.18
<hr/>			
MEDIA	2.07	0.26	0.27

El "cluster" I a su vez está formado por los "subclusters" A, B, C, D y E.

El "subcluster" A está integrado por 12 TEs (1-12), de los cuales el 1 y el 10 están constituidos por cepas de serotipo IA mientras que los TEs 4, 6, 7, 9, 11 y 12 incluyen sólo cepas de serotipo IB; en los TEs 2 y 8 encontramos cepas de ambos serotipos.

El 37.5% de las cepas resistentes a penicilina y el 27.2% de las resistentes a tetraciclina se encuentran en este "subcluster".

En el "subcluster" B se incluyen 6 TEs (13-18). Los TEs 15 y 18 están representados por cepas de serotipo IA y los TEs 14 y 17, por cepas de serotipo IB, encontrándose cepas de ambos serotipos en los TEs 13 y 16.

En este "subcluster" no se encuentra ninguna cepa resistente a penicilina; el porcentaje de cepas resistentes a tetraciclina supone un 7.8%.

El "subcluster" C está formado por 2 TEs (19-20) en los que se incluyen exclusivamente cepas de serotipo IA sensibles a penicilina y tetraciclina.

El "subcluster" D está representado por 10 TEs (21-30). A los TEs 21, 26 y 30 pertenecen sólo cepas de serotipo IA; los TEs 22 y 29 incluyen solamente cepas de serotipo IB, en el resto se encuentran cepas de los dos serotipos.

En este "subcluster" se halla el 16.7% y el 29.9% de cepas resistentes a penicilina y tetraciclina respectivamente.

El "subcluster" E está constituido por 7 TEs (31-37). Los TEs 31, 32 y 33 representan cepas de serotipo IA y IB; los TEs 35, 36 y 37 cepas de serotipo IB y el 34 de serotipo IA.

A este "subcluster" pertenece el 9.1% de cepas resistentes a

tetraciclina no encontrándose ninguna cepa resistente a penicilina.

El "cluster" II está constituido por 9 TEs (38-46). Los TEs 39, 40, 41, 43, 44, 45 y 46 representan cepas de serotipo IB exclusivamente, el 42 de serotipo IA y el 38 cepas de ambos serotipos.

En este "cluster" encontramos un 45.8% de las cepas resistentes a penicilina y un 26% de las resistentes a tetraciclina.

5.2.1.3 Distribución geográfica

En la Tabla XXVI se presenta la distribución de los TEs en las diferentes Comunidades Autónomas incluidas en este estudio.

Cada Comunidad Autónoma viene representada por diferentes TEs; sin embargo ha habido TEs que han agrupado un mayor número de cepas en cada una de ellas. En Madrid y Cataluña los TEs 2 y 23 son los más representativos, en Euskadi han sido los TEs 23 y 26, en Baleares el 2 y el 28, en Asturias los TEs 23 y el 25, en Murcia aunque el número de cepas incluidas es muy pequeño el 60% pertenece al TE 25, en Castilla-León el TE mayoritario es el 23 y en Aragón a pesar del reducido número de cepas son los TEs 39 y 45 los más representativos.

TABLA XXVI. DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LOS TES

TE	O R I G E N								
	Cat.	Eus.	Mad.	Bal.	Ast.	Mur.	C-L	Ara.	Can.
1			4						
2	8	1	19	4	2	1	2	1	
3			3				1		
4	3		3				1		
5	1		1						
6			5		3				
7	1		9						
8	2		1		1				
9			2		1		1		1
10			1						
11	1		1	1					
12							1		
13	5		7	1	1				
14	2		3						
15	1								
16	2		1						
17	2		2				1		
18	1		1						
19	1								
20					1				
21			2						
22	2	2	4						
23	7	4	15	2	6		3		1

TABLA XXVI. DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LOS TE_s

TE	O R I G E N								
	Cat.	Eus.	Mad.	Bal.	Ast.	Mur.	C-L	Ara.	Can.
24	1	2	13	1	2		1		
25	1	1	11	2	7	3			
26	1	4	5		1				
27	1		7		2				
28	2	1	2	5			2		
29	1		3						
30			1						
31	3		9	1	1	1			
32	5	2	7		1				
33	5	1	5		1		2		
34	1								
35			4						
36			4		4				
37			1						
38			6						
39		1	4					2	
40	2		11						
41		1	3						
42			1	1					
43		2	1						
44			2						
45		1	3					2	
46			2						

5.2.2 Análisis multienzimático en cepas productoras de penicilinas

Hemos llevado a cabo un estudio de análisis multienzimático en 38 cepas pertenecientes a la clase auxotipo/serovar Prototrófico/AvBx, de las cuales 19 eran productoras de β -lactamasa conteniendo todas ellas el plásmido de 3.2 Mda (Tipo Africano) y 19 no productoras de penicilinas, las cuales se han agrupado en 3 TEs diferentes. Las características de las cepas que constituyen cada TE así como el perfil de alelos obtenido para las 9 enzimas ensayadas se presenta en la Tabla XXVII.

Las 9 enzimas incluidas en este estudio son:

Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6P)
Glutámico oxalacético transaminasa (GOT)
Fosfoglucomutasa (PGM)
Fosfoglucosa isomerasa (PGI)
Indofenol oxidasa (IPO)
Glutamato deshidrogenasa NADP dependiente (GD2)
Malato deshidrogenasa (MDH)
Alcohol deshidrogenasa (ADH)
6-Fosfogluconato deshidrogenasa (6PG)

De las 9 enzimas ensayadas 7 resultaron ser monomórficas y 2 (G6P y PGI) fueron polimórficas.

5.2.2.1 Diversidad genética

En la Tabla XXVIII se presentan los valores de la diversidad genética (h) encontrados en las 38 cepas estudiadas. Las 2 enzimas polimórficas han presentado como máximo 2 alelos distintos. La proporción de alelos por enzima ha sido de 1.2. La diversidad genética media (H) entre TEs fue de 0.15 y entre aislados de 0.063.

TABLA XXVII. PERFIL DE ALELOS EN CEPAS NGPP PARA LAS 9 ENZIMAS ESTUDIADAS

<u>TE</u>	<u>TOTAL</u>	<u>AvBx+</u>	<u>AvBx-</u>	<u>G6P</u>	<u>GOT</u>	<u>PGM</u>	<u>PGI</u>	<u>IPO</u>	<u>GD2</u>	<u>MDH</u>	<u>ADH</u>	<u>6PG</u>
1	18	15	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	19	3	16	2	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	0	1	1	1	2	1	1	1	1	1

AvBx+ Cepas de *N. gonorrhoeae* productoras de penicilinas.

AvBx- Cepas de *N. gonorrhoeae* no productoras de penicilinas.

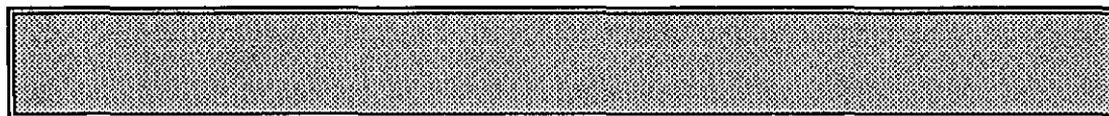


TABLA XXVIII. DIVERSIDAD GENETICA DE CEPAS NGPP

<u>ENZIMA</u>	<u>ALELOS</u>	<u>h TEs</u>	<u>h cepas</u>
G6P	2	0.7	0.51
GOT	1	0	0
PGM	1	0	0
PGI	2	0.7	0.06
IPO	1	0	0
GD2	1	0	0
MDH	1	0	0
ADH	1	0	0
6PG	1	0	0

5.2.2.2 Relaciones genéticas entre los distintos genotipos

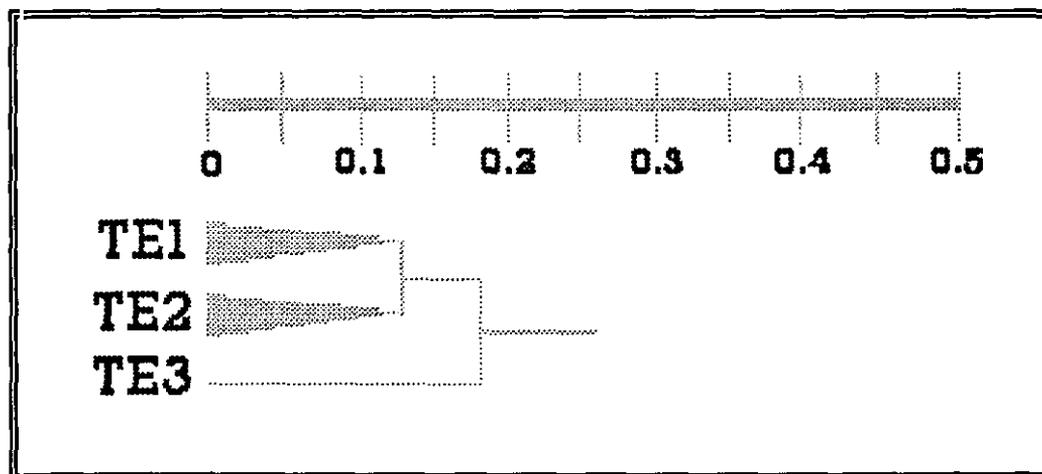
En la Figura 20 se pueden observar las relaciones genéticas entre estas 38 cepas de gonococo, dicha relación genética se representa a través de un dendrograma que se ha generado a partir de una matriz de distancias genéticas. Los TEs se han numerado en el mismo orden que aparecen en la Tabla XXVII.

La mayoría de las cepas productoras de β -lactamasa (15/19) pertenecían al TE 1, mientras que las cepas no productoras de penicilinas estaban comprendidas en el TE 2 (16/19), el TE 3 comprendía una sola cepa NGPP.

Los 3 TEs se relacionan a una distancia genética de 0.30; el "cluster" formado por los TEs 1 y 2 se encuentran a una distancia genética de 0.18.

El TE 1 y el TE 2 se diferencian sólo en el producto génico de la enzima G6P; el TE 1 y el TE 3 en el de la enzima PGI y el TE 2 y TE 3 en ambos.

FIGURA 20.- RELACIONES GENÉTICAS EN CEPAS IA_v/IB_x NGPP Y NO-NGPP



6. RELACIONES ENTRE LOS DIFERENTES MARCADORES FENOTÍPICOS Y GENOTÍPICOS UTILIZADOS

6.1 Clases Auxotipo/Serovariedad (A/S)

En las Tablas XXIX y XXX se pueden observar las relaciones que hemos encontrado entre los distintos auxotipos y serovariedades de las cepas de serotipo IA y IB respectivamente.

El auxotipo Prolina dependiente (-Pro), aparece con una mayor frecuencia asociado al serotipo IA con una diferencia que es estadísticamente significativa ($P < 0.01$). Esta mayor frecuencia lleva asociada una menor presencia del auxotipo Prototrófico, lo que no sucede en el serotipo IB produciéndose así mismo una diferencia estadísticamente significativa (Figura 21).

Las cepas de serotipo IA se han agrupado en 16 auxotipos diferentes dando lugar a 63 Clases (A/S) lo que implica una alta variabilidad, sin embargo más del 50% de las cepas se centran en 3 clases mayoritarias -Pro/rst (22.2%), Prototr/rst (16.9%) y Prototr/v (15.1%).

Dentro de las cepas con serotipo IB hemos encontrado 21 auxotipos distintos dando lugar a 234 Clases lo que supone casi 4 veces más que en el caso de las cepas con serotipo IA, lo que indicaría una mayor variabilidad dentro de las cepas IB. Por otro lado las 5 Clases mayoritarias Prototr/ropt (12.6%), Prototr/rpyust (5.4%), Prototr/x/v (4%), Prototr/opt (3.5%) y -Pro/ropt (2.9%), solamente engloban alrededor del 30% de las cepas.

6.1.1 Distribución de Clases (A/S) entre las cepas con resistencia antimicrobianos

En las Tablas XXXI, XXXII y XXXIII, se puede observar la distribución de Clases (A/S) entre las cepas de serotipo IA y IB resistentes a penicilina, así como en las de serotipo IA y IB con resistencia moderada a penicilina

respectivamente.

Clasificando las cepas en función de la sensibilidad a penicilina, como sensibles (Pen^s), con resistencia moderada (Pen^m) y resistentes (Pen^r), la distribución por serotipos en el caso de las Pen^s sería de 341 cepas con serotipo IA (30.8%) y 765 IB (69.2%); en las Pen^m 50 cepas de serotipo IA (18.4%) y 221 IB (81.5%) y en las Pen^r 6 cepas IA (7.8%) y 71 IB (92.2%). Al comparar estos 3 grupos encontramos una mayor relación del serotipo IB con las cepas que presentan algún nivel de resistencia a penicilina ya que las diferencias en la distribución por serotipos fueron estadísticamente significativas entre las cepas Pen^r, las Pen^m y las Pen^s.

Analizando las Clases (A/S), en el serotipo IA no encontramos diferencias significativas en los 3 grupos de cepas con distintos niveles de sensibilidad a penicilina. Sin embargo en las cepas con serotipo IB aparecen claras diferencias en la distribución de Clases (A/S) comparando las cepas Pen^r con las Pen^m y las Pen^s.

Mientras que en el grupo de cepas Pen^r la Clase mayoritaria es la *Prototr/oys*, en los otros 2 grupos esta clase aparece muy esporadicamente ($P < 0.01$), de igual forma las Clases *-Pro/rop* y *-Pro/opyvvt*, muy abundantes entre las cepas Pen^r aparecen con una menor frecuencia en los otros dos grupos ($P < 0.01$). No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las Pen^s y las Pen^m.

TABLA XXIX. RELACION ENTRE AUXOTIPOS Y SEROVARIEDADES EN CEPAS DE
SEROTIPO IA

<u>AUXOTIPO</u>	<u>SEROVAR</u>	<u>N°</u> <u>CEPAS</u>	<u>AUXOTIPO</u>	<u>SEROVAR</u>	<u>N°</u> <u>CEPAS</u>
-ARG,-HYX	rst	3 (4)	PROTOTR.	o	1(192)
	rt	1		ot	8
-AHU	r	2 (3)		r	1
	v	1		ros	2
-ARG	r	1(14)		rost	21
	ro	1		rot	7
	rst	8		rs	8
	rt	1		rst	68
	t	1		rv	1
	v	2		st	1
-HIS	rost	1 (2)		t	1
	v/x	1		v	61
-HYX	rst	1 (2)	NO AUX.	v/x	15
	v	1		ot	3(11)
-LIS	rst	3 (6)		rst	1
	v	2		rt	3
	v/x	1		v	4
-MET	rst	1 (1)			
-PAHUML	rst	3 (3)			
-PRO,-ARG	ros	1(18)			
	rost	1			
	rot	1			
	rst	10			
	rt	3			
	v	2			
-PAHU	rs	1 (3)			
	v	1			
	v/x	1			
-PRO,-HYX	rst	5 (8)			
	v	3			
-PRO,-MET	v	3 (3)			
-PRO,-V	rst	1 (3)			
	v	1			
	v/x	1			
-PRO	o	1(123)			
	ost	1			
	ot	1			
	ro	1			
	rost	4			
	rot	1			
	rs	3			
	rst	88			
	rt	4			
	t	1			
	v	15			
	v/x	3			

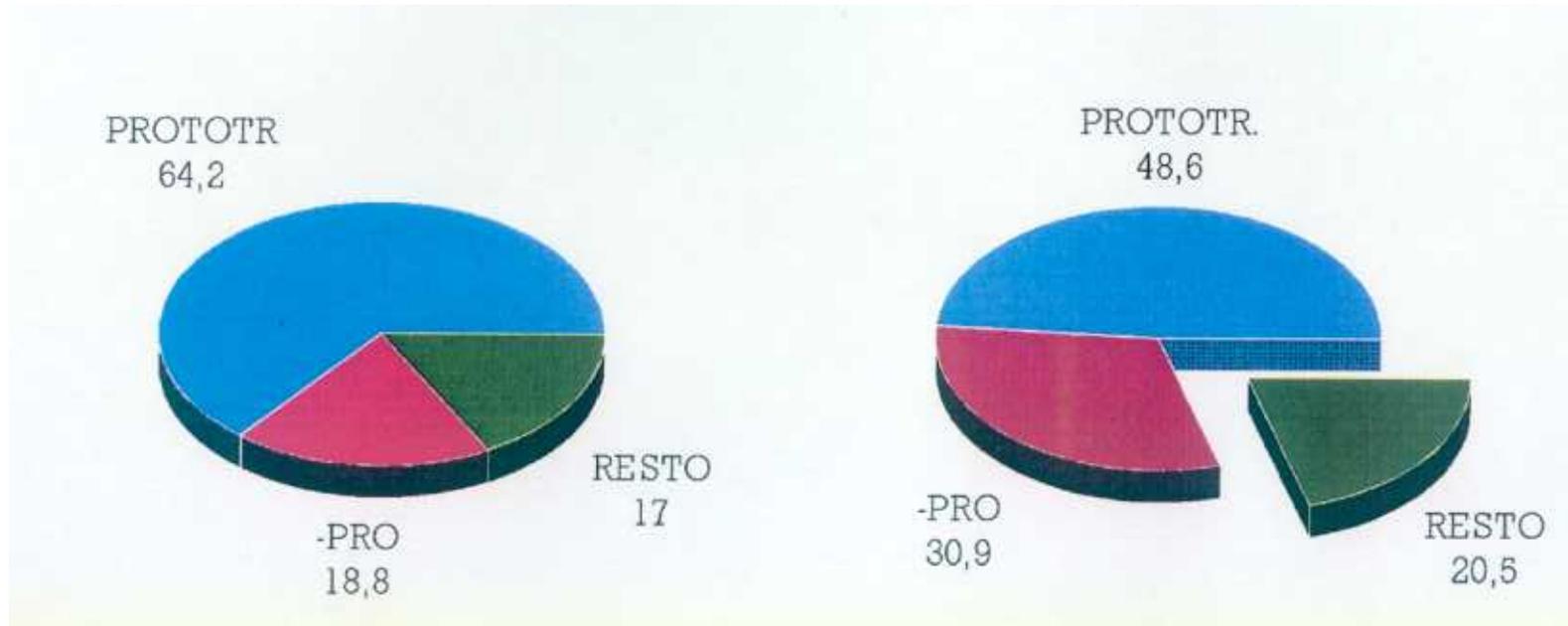
TABLA XXX. RELACION ENTRE AUXOTIPOS Y SEROVARIEDADES EN CEPAS DE SEROTIPO IB

<u>AUXOTIPO</u>	<u>SEROVAR</u>	<u>N°</u> <u>CEPAS</u>	<u>AUXOTIPO</u>	<u>SEROVAR</u>	<u>N°</u> <u>CEPAS</u>
-ARG,-HYX	pyst	1 (2)	-MET	rop	1 (4)
	x	1		ropt	3
-AHU	rpyst	1 (1)	-PAHU	rpyust	1 (1)
-ARG,-MET	ropt	1 (2)	-PRO,-ARG	opt	4(48)
	rpt	1		opvt	1
-ARG	opst	1(22)		opyt	4
	opt	3		oyst	1
	opyst	3		pyst	3
	opyvst	1		pyust	1
	oys	1		pyvst	3
	rop	1		pyvt	1
	ropst	1		ropst	1
	ropt	7		ropt	7
	ropvt	1		ropyt	5
	ropyt	1		ropyust	3
	ropyut	1		ropyvt	1
	x	1		rpt	1
-HIS	opt	1 (5)		rpyust	1
	oys	1		rpyvst	1
	r	1		rpyvst	1
	ropyt	1		x	4
	rpyut	1		x/v	1
-HYX	oys	1(15)		yus	1
	oyt	1		yvst	2
	pyt	1	-PAH	opyut	1 (3)
	pyvst	1		pyvst	1
	ropt	1		ropvt	1
	ropyst	1	-PRO,-HYX	opt	2(18)
	ropyust	1		opyst	1
	rpyust	2		opyust	1
	x	5		opyvst	1
	x/v	1		opyvt	1
-LEU	opyt	1 (3)		pyst	1
	ropt	2		pyvst	1
-LIS	opt	2(24)		pyvt	1
	opyst	1		ropt	2
	oys	1		ropyt	2
	pyst	3		ropyut	1
	pyust	1		rpyt	2
	pyvst	3		rpyust	2
	ropt	1	-PRO,-LEU	opt	1 (2)
	ropyst	1		rop	1
	rpyust	1	-PRO,-MET	ropt	1 (4)
	rpyut	1		rpyt	1
	x	3		rpyust	2
	x/v	4	-PRO,-V	pyvst	1 (1)
	yvt	2			

RELACION ENTRE AUXOTIPOS Y SEROVARIEDADES EN CEPAS DE SEROTIPO IB

<u>SEROVAR</u>	<u>Nº</u> <u>CEPAS</u>	<u>AUXOTIPO</u>	<u>SEROVAR</u>	<u>Nº</u> <u>CEPAS</u>
opst	1(199)	-V	opyt	1 (5)
opt	15		rop	1
out	1		ropt	1
ovt	4		opyvst	1
oyst	3		opyvt	1
oyt	3	PROTOTR.	o	2(679)
oyust	4		op	1
oyut	2		opoyut	1
oyvst	12		opst	7
oyv	1		opt	37
oyvt	1		opust	1
ost	1		oput	1
ost	4		opvt	6
ost	10		opyst	14
ot	1		opysvt	1
ovt	20		opyt	11
ovt	3		opyu	1
ovt	8		opyust	4
ovst	4		opyut	3
ovt	31		opyvst	14
ovt	5		opyv	1
ovst	1		opyvs	1
ovt	2		opyvt	2
ovvst	1		os	1
ovvt	1		ost	2
ovt	2		ot	1
oyst	3		ovst	1
oyt	8		oys	18
oyu	1		oyst	1
oyust	1		oysv	1
oyut	1		oyvvs	1
oyvst	1		oyvst	1
oyvvt	2		oyvst	1
oyvt	2		puv	1
oyt	1		puvt	1
oyt	3		pyst	7
oyst	1		pyust	6
oyt	3		pyut	1
oyst	7		pyvst	31
oyvst	1		pyvt	6
oyvt	1		rop	27
oyvt	1		ropst	12
oyvt	5		ropt	133
oyvt	2		ropu	1
oyvt	1		ropust	2
oyst	1		roput	3
oyt	11		ropvst	3
oyt	1		ropvt	6

FIGURA 21.- DISTRIBUCION DE AUXOTIPOS EN FUNCION DE SEROTIPOS



IB

IA

TABLA XXXI. DISTRIBUCION DE CLASES (A/S) ENTRE LAS CEPAS Pen' DE SEROTIPO IA Y IB

<u>AUXOTIPO</u>	<u>SEROVAR</u>	<u>Nº</u> <u>CEPAS</u>
IA		
-PRO	rat	3 (3)
PROTOTR.	rat	2 (2)
NO AUX	v	1 (1)
IB		
-ARG,-HYX	pyst	1 (1)
-LIS	oys	1 (1)
-PRO,-HYX	opyust	1 (1)
-PRO,-ARG	opyt	1 (4)
	ropt	2
	yus	1
-PRO	opt	1(25)
	opyst	1
	opyt	1
	opyuvt	5
	pyust	1
	rop	5
	ropt	4
	ropvt	1
	rpyust	1
	rpyuvst	1
	yuvt	4
PROTOTR.	opt	4(39)
	opvt	1
	opyst	2
	opyt	3
	opyust	2
	ovst	1
	oys	6
	oysv	1
	pyst	1
	pyust	1
	pyuvt	5
	rop	1
	ropt	4
	ropvt	1
	ropyat	1
	ys	1
	yust	1
	yuvt	3

TABLA XXXII. DISTRIBUCION DE CLASES (A/S) ENTRE LAS CEPAS Pen[™] DE SEROTIPO IA

<u>AUXOTIPOS</u>	<u>SEROVAR</u>	<u>Nº</u> <u>CEPAS</u>
-AHU	r	1 (1)
-ARG	r	1 (7)
	ro	1
	rst	3
	rt	1
	t	1
-LIS	rst	2 (2)
-PRO,-ARG	rst	1 (1)
-PRO,-HYX	v	1 (1)
-PRO,-V	rst	1 (1)
-PRO	rst	9(11)
	v	2
PROTOTR.	ros	2(26)
	rost	3
	rst	11
	rsv	1
	st	1
	v	8

TABLA XXXIII. DISTRIBUCION DE CLASES (A/S) ENTRE LAS CEPAS PenTM DE SEROTIPO IB

<u>AUXOTIPO</u>	<u>SEROVAR</u>	<u>N°</u> <u>CEPAS</u>	<u>AUXOTIPO</u>	<u>SEROVAR</u>	<u>N°</u> <u>CEPAS</u>	
-ARG,-MET	ropyut	1 (1)	-PRO,-HYX	opt	1 (3)	
-PAHU	pyvut	1 (2)		opyvt	1	
	ropyust	1		ropt	1	
-PRO,-LEU	opt	1 (1)		-V	ropt	1 (2)
-PRO,-MET	rpyt	1 (1)		rpyvut	1	
-PRO	opst	1(50)		PROTOTR.	opyut	1(128)
	opt	4		opst	3	
	opvt	2		opt	6	
	opyt	1		opvt	1	
	opyust	3		opyst	4	
	opyut	1		opyt	2	
	opyvut	1		opyvut	4	
	opyvt	1		os	1	
	pyst	1		oyst	1	
	pyust	4		oyvut	1	
	pyuvst	5		pvt	1	
	pyvt	1		pyst	2	
	rop	1		pyust	3	
	ropt	7		pyvut	4	
	ropu	1		pyvt	1	
	ropvut	1		rop	7	
	ropvt	1		ropt	17	
	ropyt	3		roput	2	
	ropyu	1		ropvut	2	
	ropyvt	1		ropvt	1	
	rpyt	1		ropyst	1	
	x	3		ropyt	10	
	yvut	4		ropyust	4	
	yvt	1		ropyut	2	
-ARG	opyst	2 (4)		ropyvst	2	
	ropt	1		ropyvt	2	
	x	1		rot	1	
-HIS	r	1 (2)		rpt	7	
	ropyt	1		rput	1	
-HYX	pyt	1 (3)		rpyst	2	
	ropyust	1		rpyu	1	
	x	1		ropyust	8	
-LIS	opt	1 (5)		ropyvut	2	
	pyst	2		rst	1	
	pyust	1		ryust	1	
	pyvut	1		x	8	
-PRO,-ARG	opt	2(16)		x/v	4	
	oyst	1		ys	1	
	pyvut	2		yvt	1	
	ropst	1		yvut	5	
	ropyt	3		ropst	1 (3)	
	ropyust	2		ropyt	1	
	rpt	1		yvut	1	
	ropyust	1				
	x	2				
	yvut	1				
				NO AUX.		

En las Tablas XXXIV y XXXV se presenta la distribución de Clases (A/S) de las cepas resistentes a tetraciclina con serotipo IA y IB respectivamente.

La distribución por serotipos de las cepas resistentes a tetraciclina (Tet^r) no presentó diferencias significativas cuando se comparó con las cepas sensibles (Tet^s).

En cuanto a las Clases (A/S) en las cepas con serotipo IA no hay diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos de cepas Tet^r y Tet^s. Sin embargo en el grupo de cepas con serotipo IB nuevamente la Clase mayoritaria dentro de las Tet^r es la es la Prototr/oys que junto con la Prototr/ys alcanzan una frecuencia mucho mayor que en el grupo de las Tet^s ($P < 0.01$).

6.2 Combinación del Análisis Multienzimático con la Auxotipia y las Serovariedades

6.2.1 Serovariedades y Tipos Electroforéticos

En las Tablas XXXVI y XXXVII se puede observar la distribución de las serovariedades de las cepas con serotipo IA y IB en los diferentes Tipos Electroforéticos.

El serotipo IA y IB se reparten de forma más o menos homogénea a lo largo del dendrograma (Figura 19), sin embargo encontramos más acumulación de cepas con serotipo IB en el "cluster" II, en el que sólo un 1.1% de las cepas son de serotipo IA.

En cuanto a las serovariedades, encontramos que la misma serovariedad aparece distribuida en diferentes TEs y que varias serovariedades distintas forman parte de un mismo TE.

Hay que destacar que las cepas con serovariedad IA/v y IA/v/x sólo aparecen en el "cluster" I. Entre las cepas con serotipo IB las IB/rpt, IB/rpyt y

IB/rpyust sólo aparecen en el "cluster" I. En ambos casos son grupos con un número suficientemente alto de cepas como para que pudieran aparecer en los dos "clusters".

TABLA XXXIV. DISTRIBUCION DE CLASES (A/S) ENTRE LAS CEPAS Tet^r DE
SEROTIPO IA

<u>AUXOTIPO</u>	<u>SEROVAR</u>	<u>Nº</u> <u>CEPAS</u>
-ARG,-HYX	rt	1 (1)
-AHU	r	1 (1)
-ARG	r	1 (1)
-HIS	rost	1 (2)
	v/x	1
-LIS	rst	1 (1)
-PRO,-ARG	ros	1 (6)
	rst	3
	rot	1
	rt	1
-PAHU	rs	1 (2)
	v	1
-PRO,-HYX	rst	2 (2)
	v	2
-PRO,-V	v/x	1 (1)
-PRO	ost	1(40)
	rost	1
	rs	2
	rst	30
	rt	1
	v	4
	v/x	1
PROTOTR.	ros	2(48)
	rost	6
	rs	2
	rst	20
	v	14
	v/x	4
NO AUX.	rt	1 (2)
	v	1

TABLA XXXIV. DISTRIBUCION DE CLASES (A/S) ENTRE LAS CEPAS Te^r DE SEROTIPO IB

<u>AUXOTIPO</u>	<u>SEROVAR</u>	<u>Nº</u> <u>CEPAS</u>	<u>AUXOTIPO</u>	<u>SEROVAR</u>	<u>Nº</u> <u>CEPAS</u>
-ARG,-HYX	pyst	1 (2)	-PRO	yvt	1
	x	1		yuvst	1
-ARG	oys	1 (5)	PROTOTR.	opst	1(157)
	ropt	1		opt	11
	ropvt	1		oput	1
	ropyut	1		opvt	4
	x	1		opyst	8
-HYX	pyt	1 (1)		opyt	9
-LEU	opyt	1 (1)		opyust	2
-LIS	opt	1 (4)		opyut	1
	opyst	1		opyvs	1
	oys	1		ots	1
	x/v	1		ovst	1
-MET	ropt	1 (1)		oys	16
-PRO,-ARG	opvt	1(12)		oyst	1
	opyt	3		oysv	1
	pyust	1		oyvvs	1
	pyvst	3		pvt	1
	ropu	2		pyst	1
	ropyvt	1		pyust	1
	x	1		pyut	1
-PAHU	opyut	1 (1)		pyvst	14
-PRO,-HYX	opyust	1 (5)		pyvt	1
	opyvst	1		rop	3
	opyvt	1		ropst	1
	rpyt	1		ropt	11
	rpyust	1		ropvst	1
-PRO,-LEU	rop	1 (1)		ropvt	1
-PRO,-MET	ropt	1 (1)		ropyst	6
-PRO	opst	1(71)		ropyt	3
	opt	4		ropyust	4
	opvt	2		ropyut	2
	opyst	2		ropyvst	1
	opyt	3		ropyvst	1
	opyust	2		ropyvt	2
	opyvst	1		rot	1
	opyvt	1		rpyst	6
	pyst	3		rpyust	4
	pyust	6		rpyvst	2
	pyut	1		ryust	1
	pyvst	7		x	1
	rop	5		x/v	9
	ropt	10		ys	11
	ropu	2		yus	1
	ropvst	1		yust	1
	ropvt	2		yvt	6
	ropyst	1	-V	opyt	1 (2)
	ropyt	1	NO AUX.	rpyvst	1
	ropyvt	1		yvt	1 (1)
	rpyst	1			
	rpyt	1			
	rpyust	1			
	rpyvst	1			
	rpyvt	1			
	yust	1			
	yvst	6			

TABLA XXXVI. RELACION ENTRE SEROVARIEDADES Y TE_s EN CEPAS DE SEROTIPO IA

<u>SEROVAR</u>	<u>TE</u>	<u>N° CEPAS</u>	<u>N° TE_s</u>		
r	23	1 (2)	2		
	33	1			
rt	13	1 (3)	3		
	25	1			
	42	1			
rot	10	1 (4)	2		
	26	3			
rat	1	4(36)	14		
	2	6			
	3	1			
	8	1			
	13	7			
	15	1			
	18	1			
	19	1			
	21	1			
	28	3			
	31	7			
	32	1			
	34	1			
	38	1			
	rost	21		1 (8)	6
23		2			
24		2			
28		1			
42		1			
43		1			
ost	31	1 (1)	1		
ot	23	1 (4)	3		
	26	2			
	31	1			
t	31	1 (1)	1		
v	5	1(15)	9		
	18	1			
	20	1			
	23	3			
	24	1			
	26	3			
	27	1			
	30	1			
	31	3			
	v/x	13		1 (6)	6
		18		1	
19		1			
23		1			
27		1			
32		1			

TABLA XXXVII. RELACION ENTRE SEROVARIEDADES Y TE_s EN CEPAS DE SEROTIPO IB

<u>SEROVAR</u>	<u>TE</u>	<u>N° CEPAS</u>	<u>N° TE_s</u>	<u>SEROVAR</u>	<u>TE</u>	<u>N° CEPAS</u>	<u>N° TE_s</u>
o	4	1 (1)	1	pyvt	6	4(15)	10
opst	23	1 (3)	3		7	2	
	25	1			8	1	
	28	1			28	2	
opt	2	3 (22)	13		29	1	
	5	1			32	1	
	7	1			33	1	
	16	1			36	1	
	23	3			39	1	
	24	2			45	1	
	25	1		pyvt	6	1 (2)	2
	27	3			9	1	
	28	1		r	40	1 (1)	1
	31	1		rop	2	1(15)	7
	32	3			23	3	
	36	1			25	2	
	40	1			32	2	
oput	36	1 (1)	1		39	1	
opvt	7	1 (3)	3		40	5	
	24	1			41	1	
	25	1		ropst	23	2 (3)	2
opyst	9	1 (5)	4		32	1	
	23	1		ropt	2	8(43)	14
	25	1			13	3	
	38	2			16	1	
opyt	6	1 (6)	5		17	1	
	25	2			23	13	
	27	1			24	3	
	29	1			25	4	
	36	1			27	1	
opyut	2	1 (1)	1		28	1	
opyvvt	29	1 (1)	1		33	3	
opyvt	7	1 (2)	2		36	2	
	28	1			39	1	
os	2	1 (1)	1		41	1	
oys	9	1 (4)	3		45	1	
	25	2		ropu	41	1 (2)	2
	33	1			44	1	
oyst	2	1 (2)	2	roput	27	1 (2)	2
	25	1			32	1	
oysv	9	1 (1)	1	ropuvst	14	1 (1)	1
pyst	2	1 (7)	7	ropuvt	27	1 (1)	1
	6	1		ropvt	25	1 (3)	3
	9	1			38	1	
	27	1			41	1	
	33	1		ropyst	4	1 (4)	4
	44	1			23	1	
	46	1			36	1	
pyust	6	1 (2)	2		40	1	
	23	1		ropyt	2	1 (9)	6
					4	2	
					8	2	
					23	1	
					33	2	
					39	1	

TABLA XXXVII. RELACION ENTRE SEROVARIEDADES Y TE_s EN CEPAS DE SEROTIPO IB

<u>SEROVAR</u>	<u>TE</u>	<u>Nº CEPAS</u>	<u>Nº TE_s</u>	<u>SEROVAR</u>	<u>TE</u>	<u>Nº CEPAS</u>	<u>Nº TE_s</u>
ropyust	3	1 (3)	3	rpyuvt	7	1 (2)	2
	32	1			24	1	
	33	1			22	5(13)	5
ropyut	3	1 (2)	2	23	1		
	25	1		24	3		
ropyuvst	17	1 (3)	3	32	1		
	29	1		40	3		
	45	1		x/v	3	1 (7)	5
ropyvut	23	1 (1)	1	11	1		
ropyvt	2	1 (4)	3	13	1		
	25	2		22	3		
	32	1		24	1		
	39	1 (1)	1	25	1 (3)	3	
rp	2	1 (6)	6	39	1		
	14	1		46	1		
	24	1		yat	25	1 (1)	1
	28	1		yuvt	2	2(16)	11
	32	1		7	1		
	33	1		13	1		
rput	28	2 (2)	1	14	1		
rpvt	32	1 (1)	1	24	1		
rpys	17	1 (1)	1	35	3		
rpyst	17	1 (5)	4	38	1		
	24	2		39	1		
	33	1		40	1		
	40	1		43	1		
	4	1 (7)	6	45	3		
	7	1		yvt	4	1 (5)	5
rpyt	17	1		7	1		
	23	2		24	1		
	25	1		35	1		
	36	1		38	1		
	11	1 (3)	2	yuvst	7	1 (1)	1
	14	2					
rpyust	2	8(14)	6				
	4	1					
	11	1					
	25	2					
	28	1					
	33	1					
rpyuvst	2	1 (4)	4				
	24	1					
	33	1					
	43	1					

6.2.2 Auxotipos y Tipos Electroforéticos

En la Tabla XXXVIII se puede apreciar la distribución de los auxotipos encontrados en los distintos TEs.

Los auxotipos se reparten de una manera homogénea a lo largo de los TEs. *Sin embargo hay que destacar que en el TE 13 no aparecen cepas con auxotipo Prototr, estando constituido exclusivamente por cepas -Pro y -Pro,-Arg; igualmente el TE 44 del "cluster" II está integrado solamente por cepas de auxotipo -Pro.*

A lo largo del dendrograma (Figura 19), aparecen algunos TEs que están formados sólo por cepas de auxotipo Prototr. estos TEs son el 3, 18, 35, 38 y 46.

6.2.3 Clases (A/S) y Tipos Electroforéticos

En la tabla XXXIX y XL se observa la composición de los TEs en función de las Clases (A/S) en cepas con serotipo IA y IB respectivamente.

No se observa ninguna relación entre las Clases (A/S) y los TEs.

TABLA XXXVIII. RELACION ENTRE AUXOTIPOS Y TEs

<u>AUXOTIPO</u>	<u>TE</u>	<u>N° CEPAS</u>	<u>N° TEs</u>	<u>AUXOTIPO</u>	<u>TE</u>	<u>N° CEPAS</u>	<u>N° TEs</u>
-ARG,-MET	2	1 (1)	1	-PRO	1	2(74)	28
-ARG	2	1 (9)	7		2	11	
	9	1			4	1	
	21	1			5	1	
	23	1			6	4	
	26	1			7	4	
	27	1			8	3	
	31	3			13	4	
-HIS	33	1 (2)	2		14	2	
	40	1			16	1	
-HYX	24	3 (7)	4		17	1	
	25	2			22	3	
	28	1			23	5	
	39	1			25	2	
-LEU	25	1 (1)	1		26	2	
-LIS	4	1 (5)	4		27	1	
	7	2			28	4	
	11	1			29	3	
	32	1			30	1	
-MET	2	1 (3)	3		31	3	
	8	1			32	2	
	23	1			33	3	
-PRO,-ARG	2	3(19)	15		36	1	
	6	1			40	3	
	9	1			41	2	
	13	1			43	1	
	15	1			44	1	
	22	1			45	3	
	23	1		-V	7	1 (3)	3
	24	1			33	1	
	27	1			39	1	
	28	1					
	31	2					
	32	2					
	36	1					
	42	1					
	44	1					
-PAHU	32	1 (1)	1				
-PRO,-HYX	17	1 (3)	3				
	23	1					
	26	1					
-PRO,-LEU	24	1 (1)	1				
-PRO,-MET	4	1 (1)	1				
-PRO,-V	19	1 (2)	2				
	27	1					

TABLA XXXVIII. RELACION ENTRE AUXOTIPOS Y TE_s

<u>AUXOTIPO</u>	<u>TE</u>	<u>N°</u> <u>CEPAS</u>	<u>N° TE_s</u>
PROTOTR.	1	2(220)	41
	2	21	
	3	4	
	4	4	
	5	1	
	6	3	
	7	3	
	9	3	
	10	1	
	11	2	
	12	1	
	14	3	
	16	2	
	17	3	
	18	2	
	19	1	
	20	1	
	21	1	
	22	4	
	23	28	
	24	15	
	25	20	
	26	7	
	27	6	
	28	6	
	29	1	
	31	6	
	32	9	
	33	9	
	34	1	
	35	4	
	36	6	
	37	1	
	38	6	
	39	5	
	40	9	
	41	2	
	42	1	
	43	2	
	45	3	
	46	2	

TABLA XXXIX. RELACION ENTRE LAS CLASES (A/S) Y LOS TE₆ EN CEPAS DE SEROTIPO IA

<u>TE</u>	<u>AUXOTIPO</u>	<u>SEROVAR</u>	<u>Nº CEPAS</u>	<u>TE</u>	<u>AUXOTIPO</u>	<u>SEROVAR</u>	<u>Nº CEPAS</u>
1	-PRO	rst	2 (4)	27	-PRO,-V	v	1 (2)
	PROTOTR.	rst	2		PROTOTR.	v/x	1
2	-PRO	rst	4 (6)	28	PROTOTR.	rost	1 (1)
	PROTOTR.	rst	2	30	-PRO	v	1 (1)
3	PROTOTR.	rst	1 (1)	31	-PRO	ost	1(14)
5	-PRO	v	1 (1)			rst	1
8	-MET	rst	1 (1)			v	1
10	PROTOTR.	rot	1 (1)		-PRO,-ARG	rost	1
13	-PRO	rst	3 (9)			rst	1
		rt	1		-ARG	rst	2
	PROTOTR.	rst	4			t	1
		v/x	1		PROTOTR.	rst	3
15	-PRO,-ARG	rst	1 (1)			v	2
16	-PRO	rst	1 (1)		NO AUX.	ot	1
18	PROTOTR.	v	1 (2)	32	-PRO	rst	1 (2)
		v/x	1		PROTOTR.	v/x	1
19	-PRO,-V	rst	1 (2)	33	PROTOTR.	r	1 (1)
	PROTOTR.	rst	1	34	PROTOTR.	rst	1 (1)
20	PROTOTR.	rot	1 (1)	38	PROTOTR.	rst	1 (1)
21	PROTOTR.	rost	1 (2)	42	PROTOTR.	rost	1 (2)
	-ARG	rst	1		-PRO,-ARG	rt	1
23	-ARG	r	1 (8)	43	PROTOTR.	rost	1 (1)
	PROTOTR.	ot	1				
		rost	2				
		v	3				
		v/x	1				
24	PROTOTR.	rost	2 (3)				
		v	1				
25	-PRO	rt	1 (1)				
26	PROTOTR.	ot	2(11)				
		rot	1				
		rst	1				
		v	2				
	-ARG	rst	1				
	-PRO	rot	1				
		v	1				
	-PRO,-HYX	rst	1				

TABLA XL. RELACION ENTRE LAS CLASES (A/S) Y LOS TE₂ EN CEPAS DE SEROTIPO IB

<u>TE</u>	<u>AUXOTIPO</u>	<u>SEROVAR</u>	<u>N° CEPAS</u>	<u>TE</u>	<u>AUXOTIPO</u>	<u>SEROVAR</u>	<u>N° CEPAS</u>
2	-PRO	ropt	4(32)	13	-PRO,-ARG PROTOTR.	ropt	1 (5)
		rop	1			ropt	2
		ropyt	1			x/v	1
		opyut	1			yuvt	1
	-PRO,-ARG	oyst	1	14	-PRO PROTOTR.	ropuvst	1 (5)
		ropt	1			yuvt	1
		rpyuvst	1			rpt	2
	-ARG	opt	1	16	PROTOTR.	rpyu	1
		rpt	1			opt	1 (2)
	-ARG,-MET	ropt	1	17	-PRO -PRO,-HYX PROTOTR.	ropt	1
		opt	2			ropt	1 (5)
	-MET PROTOTR.	os	1	22	-PRO -PRO,-ARG PROTOTR.	rpyt	1
		pyst	1			ropuvst	1
		ropt	4			rpys	1
		ropyvt	1			rpyst	1
		rpyust	8			x	3 (8)
yuvt		2	x			1	
ropyust		1 (3)	x/v			3	
ropyut		1	opst			1 (30)	
x/v		1	ropt			4	
yvt		1 (7)	-PRO,-ARG			ropt	1
4	-PRO -PRO,-MET -LIS PROTOTR.	rpyt	1	23	-PRO,-ARG -PRO,-HYX -MET PROTOTR.	opt	1
		ropyst	1			rop	1
		o	1			opt	2
		ropyt	2			opyst	1
5	PROTOTR.	ropyust	1	24	NO AUX. -PRO,-LEU -PRO,-LEU -HYX PROTOTR.	pyust	1
		opt	1 (1)			pyust	1
		pyust	1 (8)			rop	2
6	-PRO -PRO,-ARG PROTOTR.	pyuvt	2	24	-PRO,-LEU -PRO,-LEU -HYX PROTOTR.	ropst	2
		pyvt	1			ropt	7
		opyt	1			ropyst	1
		pyst	1			ropyt	1
		pyuvt	2			ropyuvt	1
		opvt	1(10)			rpyt	2
7	-PRO -LIS -V PROTOTR.	pyuvt	1	24	NO AUX. -PRO,-LEU -PRO,-LEU -HYX PROTOTR.	x	1
		yuvst	1			ropt	1
		yuvt	1			opt	1 (17)
		pyuvt	1			ropt	1
		yvt	1			x	3
		rpyuvt	1			opt	1
		opt	1			opvt	1
		opyvt	1			ropt	2
		rpyt	1			rpt	1
		pyuvt	1 (3)			rpyst	2
8	-PRO	ropyt	2	24	-PRO,-LEU -PRO,-LEU -HYX PROTOTR.	rpyuvt	1
		pyst	1 (5)			rpyuvt	1
9	-PRO,-ARG -ARG PROTOTR.	opyst	1	24	-PRO,-LEU -PRO,-LEU -HYX PROTOTR.	x/v	1
		oys	1			yuvt	1
		oysv	1			yvt	1
		pyvt	1				
		rpyu	1 (3)				
		x/v	1				
11	-LIS PROTOTR.	rpyst	1				
		ropt	1 (1)				

TABLA XL. RELACION ENTRE LAS CLASES (A/S) Y LOS TE_s EN CEPAS DE SEROTIPO IB

TE	AUXOTIPO	SEROVAR	Nº CEPAS	TE	AUXOTIPO	SEROVAR	Nº CEPAS		
25	-PRO -LEU -HYX PROTOTR.	rop	1(24)	33	-PRO -HIS -V PROTOTR.	pyst	1(13)		
		opyt	1			ropyt	1		
		oys	1			rpt	1		
		ropyust	1			oys	1		
		opst	1			ropyust	1		
		opt	1			pyuvt	1		
		opvt	1			ropt	3		
		opyst	1			ropyt	1		
		opyt	1			ropyust	1		
		oys	1			rpyst	1		
		oyst	1			rpust	1		
		rop	1			yuvt	3 (4)		
		ropt	1			yvt	1		
		ropvt	1	35	PROTOTR.	rapr	1 (8)		
		ropyut	1			opyt	1		
		ropyvt	2			opt	1		
		rpvt	1			oput	1		
		ropyust	1			pyuvt	1		
		ys	1			ropt	1		
		yvt	1			ropyust	1		
ropt	1 (8)	rpvt	1						
opyt	1	37	PROTOTR.			ropvt	1 (1)		
opt	1					38	PROTOTR.	opyst	2 (5)
opt	2	ropvt	1						
pyst	1	yuvt	1						
roput	1	yvt	1						
ropvt	1	pyuvt	1 (7)						
opt	1(11)	rop	1						
opyvt	1	ropt	1						
pyuvt	1	ropyt	1						
ropyust	1	rp	1						
pyuvt	1	ys	1						
ropyst	1	yuvt	1						
opst	1	opt	1(13)						
ropt	1	rop	2						
rpt	1	r	1						
rput	2	rop	3						
27	-PRO -PRO,-ARG -ARG PROTOTR.	opyt	1 (4)	39	-HYX -V PROTOTR.	ropyust	1		
		opyvt	1			ropyt	1		
		pyuvt	1			rp	1		
ropyust	1	ys	1						
pyuvt	1	yuvt	1						
ropyst	1	opt	1(13)						
opst	1	rop	2						
ropt	1	-HIS	1						
rpt	1	PROTOTR.	3						
rput	2	rop	1						
28	-PRO -PRO,-ARG -HYX PROTOTR.	opyt	1 (4)			40	-PRO -HIS PROTOTR.	ropyust	1
		opyvt	1					ropyt	1
pyuvt	1	x	3						
ropyust	1	yuvt	1						
pyuvt	1	rop	1 (4)						
ropyst	1	ropu	1						
opst	1	ropt	1						
ropt	1	ropvt	1						
rpt	1	yuvt	1 (2)						
rput	2	ropyust	1						
29	-PRO PROTOTR	opyt	1 (4)	41	-PRO PROTOTR.			ropu	1 (2)
		opyvt	1					ropyt	1
ropyuvst	1	ropvt	1						
pyuvt	1	yuvt	1 (2)						
opt	1 (1)	rop	1 (4)						
ropyust	1(13)	ropu	1						
opt	1	ropt	1						
rpt	1	ropvt	1						
pyuvt	1	yuvt	1 (2)						
x	1	ropyust	1						
opt	2	ropu	1 (2)						
rop	2	pyst	1						
ropst	1	pyuvt	1 (6)						
roput	1	yuvt	2						
ropyvt	1	ropt	1						
rpvt	1	ropyuvst	1						
31	PROTOTR			43	-PRO PROTOTR.	yuvt	1		
						rop	1 (4)		
32	-PRO -PRO,-ARG -PAHU -LIS PROTOTR.	opyust	1(13)			44	-PRO -PRO,-ARG -PRO PROTOTR.	ropu	1 (2)
		opt	1					ropyt	1
rpt	1	yuvt	1 (2)						
pyuvt	1	pyst	1						
x	1	pyuvt	1 (6)						
opt	2	yuvt	2						
rop	2	ropt	1						
ropst	1	ropyuvst	1						
roput	1	yuvt	1						
ropyvt	1	pyst	1 (2)						
rpvt	1	ys	1						
33	-PRO -HIS -V PROTOTR.			45	-PRO -PRO,-ARG -PRO PROTOTR.				
35	PROTOTR.					46	PROTOTR.		

..... DISCUSSION

1. ESTUDIO FILOGENETICO DEL GENERO *NEISSERIA*. UBICACION DE LA ESPECIE *N. GONORRHOEAE* MEDIANTE ANALISIS MULTIENTZIMATICO.

Muchos de los estudios de polimorfismo enzimático realizados por otros autores, se han llevado a cabo mediante electroforésis en geles de almidón. El buen resultado de la electroforésis en este tipo de geles depende en gran medida de la calidad intrínseca del propio gel de almidón, ya que al obtenerse a partir de un producto biológico, no presenta una buena reproductibilidad y puede además contener contaminantes que influyan en la calidad de los resultados obtenidos.

Sin embargo, el gel de poliacrilamida al ser un polímero sintético de un monómero de acrilamida, puede prepararse siempre a partir de reactivos altamente purificados, aportando una excelente reproductibilidad al poderse estandarizar las condiciones de polimerización.

En definitiva, los geles de poliacrilamida tienen la ventaja de ser químicamente inertes, estables en un amplio rango de pH, temperatura y fuerza iónica, así como de ser transparentes (Hames, 1990).

Por los argumentos expuestos, nosotros hemos decidido emplear geles de poliacrilamida, obteniendo una excelente resolución y reproductibilidad, lo que concuerda con estudios previos realizados en *N. meningitidis* (Berrón y cols., 1992)

Los progresos recientes de estas técnicas de análisis multientzimático mediante electroforésis en gel han permitido cuantificar el cambio genético durante el proceso de especiación. Antes de la aparición de estos métodos se disponía ya de resultados que sugerían, que en la especiación podían intervenir un cierto número de sustituciones alélicas, ya que era conocido que las especies, incluso las más próximas, eran genéticamente bastante diferentes (Ayala, 1982).

Se puede estimar la diferenciación genética entre dos poblaciones estudiando en cada una de ellas una muestra de proteínas elegidas al azar. De esta forma, los genes que codifican esas proteínas representan una muestra aleatoria

de todos los genes que nos darán información acerca de la diferenciación entre esas poblaciones. Por lo tanto, los resultados obtenidos en el estudio de un número mas o menos reducido de locus pueden ser extrapolados al conjunto del genoma.

A través de los estudios de la variabilidad de las proteínas por electroforésis podemos deducir las frecuencias alélicas y genotípicas en las poblaciones.

Al comparar dos grupos de población es muy importante el análisis de dos parámetros: 1) Identidad genética (I), es un índice de similaridad, que expresa la proporción de genes idénticos en esas dos poblaciones y 2) Distancia genética (D), que nos informa acerca del número de sustituciones alélicas por locus que se han producido durante la evolución de las dos poblaciones después de su divergencia (Ayala y Valentine, 1979). Estos dos parámetros se utilizan para medir la diferenciación genética durante el proceso de especiación.

Así pues en este caso se ha pretendido analizar dicho proceso de especiación dentro del género *Neisseria* con objeto de ubicar en el mismo a *N. gonorrhoeae*, los resultados obtenidos al realizar el estudio de polimorfismo enzimático llevado a cabo entre las diferentes especies del género *Neisseria* se presentan en el apartado 5.1 de esta memoria.

Los datos electroforéticos nos indican que las especies de este género se agrupan en dos "clusters" mayoritarios (Figura 18). En el "cluster" I se incluyen *N. polysaccharea*, *N. cuniculi*, *N. lactamica*, *N. cinerea*, *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*; en el "cluster" II encontramos las especies *N. perflava/sicca*, *N. flava*, *N. mucosa*, *N. subflava*, *N. elongata*, *N. denitrificans* y *N. macacae*. Ambos "clusters" se relacionan a una distancia genética de 0.86, lo que indica que se han producido alrededor de 86 sustituciones alélicas en 100 locus, durante sus evoluciones separadas. El índice de similaridad encontrado es de 0.22.

Si analizamos cada "cluster" por separado, observamos que las especies que forman el "cluster" I se agrupan a una distancia genética de 0.59 (59

sustituciones alélicas en 100 locus), obteniéndose un índice de similaridad de 0.44 (44 % de genes idénticos). Las especies que forman el "cluster" II se relacionan a una distancia genética de 0.84 y obtenemos un índice de similaridad de 0.22.

El valor del índice de similaridad entre cepas de la misma especie normalmente es más alto de 0.4, mientras que entre especies dicho valor es de alrededor de 0.25 (Chung y cols., 1985).

Según este criterio las especies del "cluster" I han resultado ser muy parecidas ya que el índice de similaridad encontrado es prácticamente idéntico al que se espera obtener en cepas que pertenecen a una misma especie. El valor del índice de similaridad entre los dos "clusters" coincide con el esperado entre especies de un mismo género.

Esta clasificación obtenida al aplicar electroforesis de isoenzimas, concuerda en su mayoría con los esquemas taxonómicos obtenidos a partir de análisis bioquímicos o caracteres fenotípicos (Hoke y Vedros, 1982), por comparación del genoma (Hoke y Vedros, 1982; Riou y Guibourdenche, 1987) y los que se deducen a partir de medidas de distancia inmunológica (Holten, 1974).

La única discrepancia que hemos encontrado es la ubicación de *N. cuniculi*. Algunos autores han colocado a esta especie junto con *N. caviae* y *N. ovis* en el grupo de "falsas" neiserias (Hoke y Vedros, 1982). Nosotros hemos encontrado que *N. cuniculi* se encuentra incluida en el "subcluster a" (Figura 18), donde se presentan también *N. polysaccharea*, *N. lactamica* y *N. cinerea*, con lo que pensamos que esta especie debería situarse en el grupo de las "verdaderas" neiserias; resultados similares han sido descritos con anterioridad (Chung y cols., 1985).

Admitiendo que aquellos aislados que difieren en no más de 2 ó 3 loci deben ser incluidos como miembros de un mismo clon (Selander y cols., 1986), en nuestro estudio una distancia genética de 0.3 nos indica diferencias en 2 ó 3 loci.

Según este criterio, dentro del "cluster" I, hemos encontrado 18 clones, la mayoría de los cuales estarían formados a su vez por subclones, lo que implicaría que los TEs que forman los subclones pueden haber derivado de un mismo clon ancestral; sin embargo en el "cluster" II y según la definición anterior, obtenemos únicamente 4 clones, lo que indica que las especies que componen el "cluster" I poseen una estructura de población más clonal que las especies del "cluster" II. Este hecho coincide con lo expuesto anteriormente; mientras que las especies del "cluster" I, presentan un 55 % de genes idénticos, las del "cluster" II únicamente presentan un 22 % de identidad.

De los datos obtenidos en este estudio, deducimos que algunas especies son genéticamente más homogéneas que otras; por ejemplo las cepas de *N. gonorrhoeae* se distribuyen en dos clones que se relacionan a una distancia genética de 0.35 (35 sustituciones en 100 locus), y un índice de similaridad de 0.67.

A la vista de todo lo anteriormente expuesto, podemos llegar a la conclusión de que la electroforesis de isoenzimas es una herramienta útil para diferenciar cepas y especies bacterianas que se encuentran estrechamente relacionadas. Por ejemplo en la escala electroforética *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* presentan un índice medio de similaridad de casi 0.4 en la escala de 0 a 1; lo que significa que más de la mitad de la escala es válida para diferenciar estas dos especies. Por el contrario, el valor de hibridación de ADN entre esas dos especies es del 80-90 % (Hoke y Vedros, 1982), lo que indica que solamente el 20 % de la escala de hibridación de ADN es útil para diferenciarlas.

2. ESTADO ACTUAL DE LA RESISTENCIA DE *N. GONORRHOEAE* FRENTE A ANTIMICROBIANOS EN ESPAÑA.

Desde 1943 en que se describe por primera vez el tratamiento de la gonorrea con penicilina, con un porcentaje de éxito cercano al 100 % (Mahoney y cols., 1943), hasta la actualidad, el panorama en cuanto a la sensibilidad de *N. gonorrhoeae* frente a penicilina ha cambiado dramáticamente; ya en 1976, la proporción de gonococos resistentes a este antibiótico oscilaba entre un 18-90 % dependiendo de los diferentes lugares del mundo. El problema se agrava mucho más cuando en 1976 se aislan por primera vez cepas de gonococo con alta resistencia a penicilina codificada por plásmidos (Phillips, 1976).

A partir de ese momento hasta la actualidad se ha producido un elevado incremento de cepas de gonococo resistentes a penicilina tanto por mutación cromosómica como por producción de β -lactamasa, encontrándonos en este momento con un 24.5 % de cepas resistentes por uno u otro mecanismo, con lo que el empleo de este antibiótico en el tratamiento de la gonorrea quedaría reducido a aquellos casos en los que se verifique la sensibilidad de la cepa causante de la enfermedad.

A la vista de los resultados obtenidos en este estudio (Tabla IX), en nuestro país encontramos una incidencia de cepas NGPP del 17.4 %, con una distribución anual (Figura 1) en la que se llega al 34.7 % en 1991, siendo la tasa más alta a lo largo de los 9 años estudiados.

En la distribución geográfica de cepas NGPP (Figura 2), observamos que Cataluña es la Comunidad Autónoma que presenta un mayor número de aislamientos de este tipo, coincidiendo con lo descrito en otros estudios anteriores (Baró y cols., 1987; Baró y cols., 1989), por otro lado Asturias y Baleares presentan diferencias estadísticamente significativas con el resto de las Comunidades, no conocemos cual es la causa de esta diferencia, aunque se mantiene a lo largo del estudio, lo que indicaría posibles diferencias en la estructura de la población de los gonococos en estas Comunidades.

En cuanto a la situación de las cepas no-NGPP, en la Tabla IX podemos ver como los valores obtenidos de la CMI₅₀ (0.09 µg/ml) y la CMI₉₀ (0.42 µg/ml) son realmente muy elevados, coincidiendo con la tendencia generalizada que se ha producido en otros países en el aumento de la resistencia frente a penicilina (Mavrommati y cols., 1988; Fekete y cols., 1989; Ison y cols., 1990; Lind y cols., 1991).

En la distribución anual (Figura 1), observamos que al igual que ocurría con las cepas NGPP, es en el año 1991 donde se obtiene el porcentaje más elevado (14 %) de aislamientos no-NGPP de los últimos años.

La distribución por Comunidades Autónomas refleja que no existen diferencias en cuanto a la incidencia de cepas NGPP, exceptuando Aragón en donde se obtiene el mayor porcentaje de este tipo de aislamientos, si bien, al ser un número muy reducido de cepas y concentradas en un periodo de tiempo corto, es difícil asegurar si es la situación real que se presenta en dicha Comunidad Autónoma. De igual forma hay que reseñar el caso de Murcia, donde no encontramos ninguna cepa resistente a penicilina por mutación cromosómica, aunque el número de cepas que hemos estudiado haya sido pequeño.

La tetraciclina ha sido ampliamente utilizada en el tratamiento de las uretritis, fundamentalmente en los casos en que no se podía realizar un diagnóstico etiológico.

La sensibilidad de las cepas de gonococo a tetraciclina ha ido disminuyendo a lo largo de los últimos años. Al igual que ha ocurrido con la penicilina, *N. gonorrhoeae* ha ido desarrollando diferentes mecanismos de resistencia frente a este antibiótico. Por un lado, y debido a los efectos aditivos de diferentes mutaciones cromosómicas, los gonococos han ido perdiendo sensibilidad a tetraciclina; por otro lado en 1986 se describe la aparición de cepas de gonococo con alto nivel de resistencia a tetraciclina codificada por un plásmido de 25.2 Md (Morse y cols., 1986).

De los resultados obtenidos en este estudio, observamos que el

porcentaje de cepas de gonococo resistentes a tetraciclina supone un 56.6 % cuando nos referimos al total de cepas estudiadas (NGPP y no-NGPP). En la Tabla X se presentan los resultados de sensibilidad a tetraciclina en cepas no-NGPP, donde podemos ver un elevado grado de resistencia ya que el 22.7 % de los gonococos no productores de β -lactamasa presentan resistencia frente a este antibiótico ($CMI \geq 1 \mu\text{g/ml}$), con lo que su uso en el tratamiento de la infección gonocócica estaría desaconsejado.

Estos niveles de resistencia se corresponden con los encontrados en otros países (Ison y cols., 1987; Van Klingeren y cols., 1988; Lind y cols., 1991).

En la distribución anual de las cepas no-NGPP resistentes a tetraciclina (Figura 1), se observa un paralelismo en la evolución de la resistencia a penicilina y tetraciclina, produciéndose en 1991 el mayor número de aislamientos NGRT al igual que ocurría con las cepas NGRPMC.

En cuanto a las cepas NGPP, la proporción de cepas resistentes a tetraciclina supone un 42.1 %, bien por un mayor empleo de este antibiótico en el tratamiento de la infección gonocócica producida por gonococos productores de β -lactamasa, bien porque la población de cepas NGPP española sea por naturaleza más resistente a tetraciclina. Hay que reseñar sin embargo, el descenso paulatino que se produce en estos aislamientos desde 1985 hasta 1988 llegando a ser en este año de un 7.7 % el porcentaje de cepas NGPP resistentes a tetraciclina, aunque en los años sucesivos se produce una rápida subida de cepas resistentes suponiendo en 1991 un 69.7 %. Estos cambios serán analizados más adelante junto con el análisis plasmídico de las cepas NGPP.

En la distribución geográfica de las cepas NGRT en las diferentes Comunidades Autónomas (Figura 2), destaca Aragón como la Comunidad Autónoma que presenta un mayor número de aislamientos NGRT, aunque con la misma salvedad mencionada para penicilina. Euskadi y Castilla-León son las dos Comunidades con mayor porcentaje de cepas resistentes a tetraciclina con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$) con el resto de las Comunidades Autónomas.

Debido al elevado número de cepas resistentes a tetraciclina por mutación cromosómica, el tratamiento de la gonorrea con este antibiótico no es indicado.

Los resultados de sensibilidad a espectinomicina se pueden ver en la Tabla XI donde no se observan grandes diferencias en los valores de la CMI_{50} y CMI_{90} en los dos grupos de cepas estudiados, NGPP y no-NGPP, a lo largo de estos años.

Aunque en otros países se han descrito cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a espectinomicina (Ison y cols., 1987; Schwarcz y cols., 1990), nosotros no hemos encontrado ninguna cepa resistente a este antibiótico.

La cefoxitina es un antibiótico que se recomienda en el tratamiento de la gonorrea, sobre todo en aquellos lugares donde se presenta una elevada incidencia de cepas NGPP (CDC, 1987).

En el conjunto de las cepas no-NGPP, los valores de la CMI_{50} y CMI_{90} son 0.26 y 0.87 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (Tabla XII), los cuales están en consonancia con lo descrito por otros autores (Monayar y cols., 1987; Fekete y cols., 1989).

Hay que destacar el aumento progresivo de cepas con una CMI comprendida entre 1-4 $\mu\text{g/ml}$, valores éstos considerados por algunos autores como correspondientes a cepas resistentes (Schwarcz y cols., 1990); 1983 y 1991, son los años donde se obtienen más aislamientos con un valor de CMI entre 1-4 $\mu\text{g/ml}$, correspondiendo con el mayor número de cepas NGRPMC; este hecho concuerda con lo descrito por algunos autores ya que las mutaciones responsables de la resistencia a penicilina (pen A), también confieren una disminución en la sensibilidad a las cefalosporinas de segunda y tercera generación (Fekete y cols., 1989; Ison y cols., 1990).

En el conjunto de cepas NGPP (Tabla XII), observamos una tendencia de los valores de la CMI_{50} y CMI_{90} a disminuir, aunque en 1991 se produce una

brusca subida de estos valores, siendo en este año cuando se obtienen más aislamientos de gonococo con una CMI comprendida entre 1-4 $\mu\text{g/ml}$.

Como ya indicamos en el apartado de Resultados, hemos incluido en este estudio los resultados de sensibilidad a ceftazidima en cepas NGPP y no-NGPP hasta el año 1989, debido a que al no emplearse demasiado en el tratamiento de la infección gonocócica, decidimos incluir en su lugar el estudio de sensibilidad a ceftriaxona, ya que este antibiótico se emplea de forma más generalizada.

Unicamente reseñar que los valores de la CMI_{50} y CMI_{90} encontrados, tanto en cepas NGPP como en no-NGPP han sido muy bajos y muy similares a lo largo de los años estudiados (Tabla XIII), no encontrándose ninguna cepa con un valor de CMI superior a 0.12 $\mu\text{g/ml}$.

Los resultados de sensibilidad a ceftriaxona se presentan en la Tabla XIV, donde observamos como los valores de la CMI_{50} y CMI_{90} en cepas no-NGPP, no han sufrido grandes variaciones en el muestreo de cepas que hemos llevado a cabo en este estudio, encontrándose unos valores muy similares en las cepas NGPP correspondientes a los 3 años analizados.

No hemos encontrado ninguna cepa con un valor de la $\text{CMI} > 0.06 \mu\text{g/ml}$, sin embargo cepas con una $\text{CMI} > 0.06 \mu\text{g/ml}$, que se consideran de susceptibilidad intermedia, ya se han aislado en nuestro país (Perea y cols., 1991).

Como ya hemos comentado anteriormente, los gonococos resistentes a penicilina por mutación cromosómica, presentan también una disminución en la sensibilidad a cefalosporinas, con lo que el incremento en el uso de este antimicrobiano para el tratamiento de la gonorrea podrían provocar un aumento en los niveles de resistencia a este antibiótico.

Se ha sugerido el empleo de las quinolonas, en particular la ciprofloxacina y la norfloxacina, como método alternativo en el tratamiento de la infección gonocócica (CDC, 1990) por lo que decidimos llevar a cabo un muestreo de sensibilidad a ciprofloxacina en cepas no-NGPP pertenecientes a los 9 años

estudiados; los resultados de sensibilidad a este antibiótico se reflejan en la Tabla XV.

Los valores de la CMI_{50} y CMI_{90} han sido de 0.002 y 0.01 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Este valor de la CMI_{50} coincide con lo descrito por otros autores (Gransden y cols., 1991), aunque nosotros encontramos un valor de la CMI_{90} más elevado. Esto nos indica una mayor presencia en nuestro país de cepas con sensibilidad disminuida a ciprofloxacina.

Hay que reseñar la aparición de cepas no-NGPP (3 %) con un valor de la CMI entre 0.06-0.25 $\mu\text{g/ml}$, consideradas por algunos autores como moderadamente resistentes e incluso resistentes, apareciendo en este estudio este tipo de gonococos ya en 1984 (Turner y cols., 1990).

En 1990 se describen cepas de gonococo resistentes a ciprofloxacina (Turner y cols., 1990), con lo que el empleo de este antibiótico pudiera no responder a las iniciales perspectivas suscitadas.

Al comparar la sensibilidad a penicilina frente al resto de los antibióticos utilizados en este estudio, se obtiene que el más alto nivel de resistencia cruzada, se presenta entre penicilina y ceftazidima con un coeficiente de correlación de Pearson de $r=0.65$; siendo este valor de $r=0.58$ con ceftriaxona, $r=0.42$ con tetraciclina y $r=0.49$ con cefoxitina. La menor resistencia cruzada corresponde a penicilina con ciprofloxacina ($r=0.2$) (Figura 3), que si bien es estadísticamente significativo, sugiere una asociación poco relevante, lo que en principio era de esperar por el diferente mecanismo de acción de ambos antimicrobianos.

Los coeficientes de correlación que hemos obtenido son estadísticamente significativos ($p < 0.01$), excepto en el caso de la espectinomicina ($r=0.06$), este valor nos indica una escasa resistencia cruzada con penicilina, lo cual al igual que en el caso anterior era de esperar debido a los diferentes mecanismos de resistencia que presentan los dos antibióticos.

Estos resultados concuerdan con lo descrito por otros autores (Baró y cols., 1989; Ison y cols., 1990); sugiriendo así mismo que debe existir probablemente un mecanismo de resistencia común en el que estarían implicados los cambios en la permeabilidad de la membrana externa de los gonococos.

3. APLICACION DE MARCADORES FENOTIPICOS; AUXOTIPIA Y DETERMINACION DE SEROVARIEDADES

La auxotipia ha sido el primer método utilizado en la tipificación de las cepas de *N. gonorrhoeae*, y fué desarrollado por Catlin en 1973. En el presente estudio el número de auxotipos diferentes que hemos encontrado ha sido 22, siendo el prototrófico y prolina dependiente, los obtenidos con mayor frecuencia (59 % y 22.9 % respectivamente), el resto de auxotipos han tenido una escasa representación de cepas (Figura 13), es decir, solamente 2 auxotipos concentran más del 81.9 % de las cepas. En otros países la distribución de auxotipos es muy similar a la obtenida en este estudio (Mavrommati y cols., 1988; Ison y cols., 1990; Lind y cols., 1991)

En la distribución anual de auxotipos (Figura 14), se reproduce la situación que acabamos de comentar; hay que reseñar una cierta tendencia a disminuir el auxotipo -Pro a partir del año 1987, mientras que el auxotipo -Pro, -Arg ha sufrido un ligero incremento en los últimos años. También observamos como el porcentaje de cepas no auxotipables ha ido en aumento desde 1984 hasta 1990, aunque en 1991 la frecuencia de este tipo de cepas supone únicamente un 0.5 %.

En la Figura 15 se presenta la distribución geográfica de los dos auxotipos más frecuentes encontrados en este estudio. Las cepas prototróficas han tenido una mayor presencia en Baleares y Asturias con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$) con el resto de las Comunidades. En Murcia, no encontramos ninguna cepa -Pro, aunque pueda ser debido al escaso número de cepas estudiadas. Es destacable el porcentaje tan bajo de cepas -Pro encontradas en Baleares. En el caso de Asturias y Baleares esto implicaría una mayor homogeneidad de las poblaciones desde el punto de vista de la auxotipia.

A la vista de los resultados que hemos obtenido en cuanto a la escasa variación en el número de aislamientos de diferentes auxotipos, es aconsejable que la auxotipia se emplee siempre en combinación con otros marcadores, especialmente la serotipia, con lo que se consigue una mayor

discriminación en las cepas de N. gonorrhoeae.

Al realizar la serotipia en las cepas de gonococo incluidas en esta memoria, observamos que el serotipo mayoritario ha sido el IB (74.6 %) (Figura 4); esta distribución coincide con lo descrito por otros autores (Ison y cols., 1990). La frecuencia de serotipos en las diferentes Comunidades Autónomas es un reflejo de la situación descrita anteriormente, sin embargo es reseñable la escasa proporción de cepas de serotipo IA que encontramos en Baleares.

En la determinación de serovariedades en cepas de serotipo IA, encontramos 16 serovariedades distintas, siendo mayoritarias la IA/rst (47.9 %) junto con la IA/v (24.5 %) (Figura 5), en lo que se refiere a la distribución global de cepas (no-NGPP y NGPP). Dentro de las cepas no-NGPP, la distribución que encontramos es muy parecida a la global, aunque hay que destacar una menor presencia en este grupo de las cepas IA v/x. En el conjunto de las cepas NGPP los gonococos IA/v y IA v/x son más abundantes que en el total de cepas.

Las cepas de serotipo IB se distribuyen en 83 serovariedades distintas siendo 8 las más frecuentes (Figura 6). Es reseñable el descenso en la frecuencia de cepas IB x/v dentro del grupo de cepas no-NGPP en relación al total de cepas, así como la mayor presencia de gonococos IB x/v y IB/pyvvt dentro del conjunto de las NGPP. Hay que destacar que mientras que el número de serovariedades en cepas de serotipo IA se mantiene más o menos constante a lo largo de estos años, en el caso de las cepas de serotipo IB se produce un incremento importante en el periodo de tiempo estudiado, lo cual implica una mayor variabilidad de las cepas de serotipo IB. Hay que resaltar el incremento de cepas IB/oys y IB/ys que han supuesto en 1991 el 10 % y el 6.9 % respectivamente, produciéndose un descenso paulatino a lo largo de estos años en la frecuencia de cepas IB/x y IB/rpyst.

Dentro del grupo de cepas NGPP, la presencia de gonococos IB/oys se ha ido haciendo cada vez mayor, suponiendo en 1991 prácticamente el 20 % del total de cepas NGPP de serotipo IB, mientras que las cepas IB/ropt y IB x/v han sufrido un notorio descenso dentro del conjunto de gonococos NGPP.

Cuando analizamos las relaciones que se producen entre los auxotipos y serotipos de las cepas incluidas en esta memoria, encontramos que el auxotipo -Pro se asocia significativamente ($p < 0.01$) al serotipo IA, esto explica que la presencia de cepas de serotipo IA prototróficas sea menor. La asociación de cepas de serotipo IA con los 16 auxotipos encontrados da lugar a 63 clases (A/S) (Tabla XXIX). Sin embargo, como ya hemos comentado en el apartado 6.1, más del 50 % de las cepas se distribuyen en 3 clases mayoritarias; una mayor variabilidad encontramos en las cepas de serotipo IB, donde los 21 auxotipos distintos obtenidos dan lugar a 234 clases lo que supone casi cuatro veces más que en el caso de las cepas IA aunque las 5 clases mayoritarias no engloban más que aproximadamente al 30 % de los gonococos. No hemos encontrado una relación exclusiva entre auxotipos y serovariedades aunque como acabamos de decir existen asociaciones más frecuentes entre algunos auxotipos y serovariedades.

Las asociaciones entre resistencia a antimicrobianos y determinadas clases (A/S), ya ha sido descrita con anterioridad (Bygdeman y cols., 1982) y permite de alguna forma controlar y predecir la evolución de la resistencia en función de los datos obtenidos en la población de gonococos. En la distribución por serotipos en las cepas con distintos niveles de sensibilidad a penicilina (Pen^s, Pen^m y Pen^r), observamos una mayor relación del serotipo IB con las cepas que presentan algún nivel de resistencia a penicilina. Cuando analizamos las clases (A/S), en el serotipo IA no encontramos diferencias significativas en los tres grupos de cepas con distintos niveles de sensibilidad a penicilina, sin embargo en las cepas de serotipo IB, si obtenemos asociaciones entre algunas clases y la resistencia a este antibiótico. En el grupo de las Pen^r las clases Prototr/oys, -Pro/rop y -Pro/opyvvt son más abundantes en este grupo que en las Pen^s y las Pen^m ($p < 0.01$) (Tablas XXXI, XXXII y XXXIII).

En cuanto a la distribución por serotipos de las cepas resistentes a tetraciclina, no se encuentran diferencias significativas al comparar los dos grupos de cepas Tet^r y Tet^s, igualmente no hay diferencias en las cepas de serotipo IA en esos dos grupos de cepas; sin embargo si encontramos una clara relación entre los gonococos Prototr/oys y Prototr/ys y la resistencia a tetraciclina ya que alcanzan

una proporción mucho mayor que en el grupo de las Tet^r ($p < 0.01$). Hay que destacar que, como hemos dicho anteriormente, este tipo de gonococos de la clase Prototr/oys y Prototr/ys en 1991 suponen el 10 % y el 6.9 %, siendo además más abundantes en el grupo de las Pen^r y Tet^r.

4. ANALISIS DE LAS CEPAS DE *N. GONORRHOEAE* PRODUCTORAS DE PENICILINASA MEDIANTE PLASMIDOTIPIA Y ANALISIS MULTIENTZIMATICO

La frecuencia de los distintos tipos de plásmidos (Figura 16) que hemos encontrado en este estudio concuerda con lo descrito por otros autores (Nogueira y cols., 1990), sin embargo en otros países se producen situaciones diferentes (Monayar y cols., 1987; Mavrommati y cols., 1988).

En este estudio queda reflejado un interesante cambio en el perfil plasmídico a partir de 1986, ya descrito anteriormente por el Laboratorio de Referencia de Gonococos del Centro Nacional de Microbiología (Berrón y cols., 1988). Hasta 1986 el plásmido de 4.5 Md (tipo asiático) con o sin plásmido conjugativo o de transferencia (24.5 Md) fue el más frecuentemente encontrado en las cepas NGPP, sin embargo a partir de 1986, cepas de gonococo con plásmido de tipo africano (3.2 Md), han sido las más abundantes; no obstante parece existir una cierta tendencia a que se equilibre la frecuencia de estos dos tipos de plásmidos (Figura 16), esto es indicativo de la gran movilidad que presentan cepas y plásmidos y la poca estabilidad de las poblaciones.

La proporción del plásmido de 24.5 Md en las cepas con plásmido de 4.5 Md es bastante estable en el periodo de tiempo analizado; sin embargo a partir de 1987 la frecuencia de cepas con plásmido de 3.2 Md y que además poseen el de transferencia se ha ido incrementando, con lo cual dada la alta incidencia de cepas NGPP en nuestro país, puede ser preocupante esta elevada incidencia del plásmido conjugativo, por su potencial papel como transmisor de plásmidos de resistencia.

Hemos observado que existe una coincidencia entre el aumento de cepas resistentes a tetraciclina y la mayor presencia del plásmido de 4.5 Md (Figura 17); los años en los que la frecuencia del plásmido africano ha sido mayor hemos encontrado un menor número de cepas resistentes a tetraciclina. Esto no debe tener relación con el tipo de plásmido, sino que pensamos que de una manera casual, la población de cepas con el plásmido de 4.5 Md es naturalmente más resistente.

Durante 1986 y 1987, de 74 cepas NGPP con plásmido de 3.2 Md estudiadas en nuestro laboratorio, el 51.3 % pertenecían a la clase Prototr/AvBx. A partir de 1988 este tipo de aislamientos ha ido descendiendo. Por ello, pensamos que el cambio en el perfil plasmídico podría ser causado por la introducción en nuestro país de este tipo de cepas (Berrón y cols., 1988).

Al hacer un estudio de polimorfismo enzimático en 38 cepas de la clase Prototr/AvBx de las cuales 19 eran NGPP con el plásmido de 3.2 Md y 19 no-NGPP, encontramos que estas cepas se agrupan en 3 TEs distintos (Figura 20).

Al TE1 pertenecían la mayoría de las cepas NGPP, mientras que las no-NGPP se agrupaban en el TE2; el TE3 estaba formado por una sola cepa NGPP.

La diversidad genética encontrada es de 0.235, lo que indica que estas cepas de gonococo forman un grupo con poca variabilidad genética, siendo similar a la encontrada en otras especies bacterianas que presentan una diversidad genética parecida (Ochman y cols., 1983; Selander y cols., 1985).

Actualmente las cepas Prototr/AvBx no son frecuentes entre las cepas NGPP. A la vista de los resultados obtenidos al aplicar la electroforesis de isoenzimas, pensamos que pudieran haber sido las responsables en el cambio del perfil plasmídico observado a partir de 1986.

5. APLICACION DEL ANALISIS MULTITIENZIMATICO EN LOS GRUPOS DE CEPAS DE GONOCOCO CON DIFERENTES NIVELES DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

Las 354 cepas de *N. gonorrhoeae* no productoras de β -lactamasa con diferentes niveles de sensibilidad a penicilina (Pen^r, Pen^{sr} y Pen^s), incluidas en esta memoria se han agrupado en 46 TEs diferentes (Figura 19).

La diversidad genética media entre TEs y aislados ha resultado ser muy similar de 0.26 y 0.27 respectivamente; la proporción de alelos por enzima ha resultado ser de 2.07.

Los 46 TEs encontrados se han agrupado en 2 "clusters" mayoritarios; el "cluster" I comprende 37 TEs y engloba al 87.3 % de las cepas, mientras que el "cluster" II está formado por 9 TEs, que suponen el 12.7 % del total de cepas incluidas en el estudio. Ambos "clusters" se relacionan a una distancia genética de 0.35 (35 sustituciones alélicas en 100 locus), presentándose un índice de similitud de 0.75 (75 % de genes idénticos).

Analizando cada "cluster" por separado encontramos, que el "cluster" I a su vez está formado por los "subclusters" A, B, C, D y E. En la Figura 19 podemos ver que de los 12 TEs que constituyen el "subcluster" A, dos de ellos están formados por cepas con serotipo IA, 6 por cepas IB y 4 constituidos por cepas de ambos serotipos.

En el "subcluster" B, se incluyen 6 TEs, de los cuales 2 están representados por cepas de serotipo IA, 2 por cepas IB y otros 2 por cepas de los dos serotipos.

El "subcluster" C formado por 2 TEs, en los cuales solo se incluyen cepas de serotipo IA.

Al "subcluster" D pertenecen 10 TEs, 3 integrados por cepas de serotipo IA, 2 por cepas IB y en el resto se encuentran cepas de los dos serotipos.

El "subcluster" E constituido por 7 TEs, 3 de los cuales incluyen cepas de serotipo IA y IB, 3 de serotipo IB y 1 IA.

El "cluster" II está integrado por 9 TEs, 7 de ellos son de serotipo IB, 1 de serotipo IA y 1 formado por cepas de ambos serotipos.

Si admitimos que aquellos aislados que difieren en no más de 2 ó 3 loci, deben ser incluidos como miembros de un mismo clon (Selander y cols., 1986), en nuestro caso una distancia genética de 0.18 nos indica diferencias de 2 loci, con lo que las cepas no-NGPP incluidas en este estudio se agrupan en 11 clones distintos, los cuales a su vez están formados en la mayoría de los casos por subclones.

Según este criterio, se puede admitir que los TEs que constituyen esos clones son reconocidos como subclones derivados de un mismo clon ancestral.

En cuanto a la distribución de las cepas con distintos niveles de resistencia a penicilina y tetraciclina en los distintos TEs, encontramos que las cepas Pen^r no se distribuyen de una forma homogénea en los diferentes "subclusters", sino que por el contrario, este tipo de aislamientos se agrupan en 3 "subclusters" de los anteriormente descritos. En el "subcluster" A se presenta el 37.5 % de las cepas resistentes a penicilina y el 27.2 % de las resistentes a tetraciclina.

El "subcluster" D agrupa al 16.7% y 29.9 % de cepas Pen^r y Tet^r respectivamente.

En el "cluster" II se incluyen el 45.5 % de las cepas Pen^r y el 26 % de las Tet^r.

En el "subcluster" C, no aparece ninguna cepa resistente a penicilina ni a tetraciclina. En los "subclusters" B y E, hallamos un porcentaje muy bajo de cepas Tet^r (7.1 % y 9.1 %, respectivamente), no encontrándose ninguna cepa

Pen'. Es decir, estos "subcluster" estarían conformados por cepas de gonococo con mutaciones tet pero no pen A, pen B o mtr.

Ya que la distribución de las cepas Pen' no es homogénea en todo el dendrograma, esto significa que la resistencia no está "universalmente" repartida. En el caso de *N. meningitidis* se ha llegado a la conclusión de que la aparición de la resistencia a penicilina no ha tenido lugar en un solo clon residente, ni se ha debido a la introducción de un nuevo clon (Berrón y cols., 1992). En el caso de *N. gonorrhoeae*, no parece que haya clones exclusivos en la población resistente; la resistencia moderada a penicilina si se encuentra ampliamente distribuida, debido posiblemente a que ha transcurrido un buen número de años desde su aparición, habiendo sido la transmisión fundamentalmente horizontal. Lo mismo sucede con la resistencia a tetraciclina. Sin embargo las cepas Pen' se encuentran concentradas en algunos "cluster", bien porque este nivel de resistencia ha aparecido más recientemente, bien porque en este caso la transmisión este sucediendo de una forma vertical más que horizontal.

La distribución anual de las cepas incluidas en esta memoria en los diferentes TEs, nos indica que se realiza de una forma homogénea, ya que cada TE está formado por cepas aisladas en distintos años; sin embargo el "cluster" II está integrado por cepas de *N. gonorrhoeae* que corresponden al periodo de tiempo de 1983- 1986. Hasta 1991 no vuelven a aparecer 2 cepas incluidas en este "cluster".

La distribución de los TEs en las diferentes Comunidades Autónomas (Tabla XXVI), nos indica que cada Comunidad Autónoma viene representada por diferentes TEs; sin embargo ha habido TEs que han agrupado un mayor número de cepas en cada una de ellas.

Hemos descrito anteriormente como se ha producido la distribución de los serotipos en los distintos TEs, viendo que se realiza de una forma más o menos homogénea, sin embargo hay que resaltar que se produce más acumulación de cepas con serotipo IB en el "cluster" II, en el que sólo el 1.1 % de los gonococos son de serotipo IA, probablemente debido a que en este "cluster" la

presencia de cepas resistentes es mayor y como hemos dicho anteriormente existe una asociación entre la resistencia y el serotipo IB.

En cuanto a las serovariedades, encontramos que la misma serovariedad aparece distribuida en diferentes TEs y que varias serovariedades distintas forman parte de un mismo TE (Tablas XXXVI y XXXVII); sin embargo las cepas con serovariedades IA/v, IA/v/x así como las IB/rpt, IB/rpyt y IB/rpyust, solo aparecen en el "cluster" I, presentando un número suficientemente alto de cepas como para que pudieran aparecer en los dos "clusters".

Al analizar la Tabla XXXVIII, se puede apreciar como los auxotipos se reparten también de una forma homogénea a lo largo de los TEs. Hay que resaltar, sin embargo, que en el TE 13 en el que están incluidas 14 cepas, no aparece ninguna prototrófica; existiendo por el contrario, algunos TEs que están formados sólo por cepas de auxotipo Prototr.

La relación entre los marcadores fenotípicos y genotípicos, es decir la distribución de Clases (A/S) en los distintos TEs, se presenta en las Tablas XXXIX y XL.

En las cepas con serotipo IA, cuando aplicamos la electroforesis de isoenzimas y la determinación de auxotipos, obtenemos 43 Clases distintas Auxotipo/Tipo Electroforético (A/TE), lo que implica una menor variabilidad que cuando se lleva a cabo la determinación de Clases (A/S), en donde encontrábamos 63 Clases diferentes; sin embargo las cepas se reparten de una forma más homogénea en las Clases (A/TE), ya que las 4 Clases mayoritarias Prototr./TE 23 (8.6 %), Prototr./TE 26 (7.4 %), Prototr./TE 31 (6.2 %) y Prototr./TE 13 (6.2 %); sólo engloban un 28.4 % frente al 54 % que englobaban las 3 principales Clases (A/S).

Por otro lado la aplicación de isoenzimas en las 3 principales Clases (A/S), permite discriminar éstas en un total de 20 Clases Auxotipo/Serovariedad/Tipo Electroforético (A/S/TE), con lo que se consigue llegar a una mayor caracterización de las cepas que se incluyen en estos grupos

mayoritarios, que sin la aplicación de la electroforesis de isoenzimas, no podrían diferenciadas.

En las cepas con serotipo IB, aplicando la electroforesis de isoenzimas y la determinación de auxotipos, encontramos 92 Clases (A/TE); las cuales se reparten con una homogeneidad similar en las Clases (A/TE), a la observada en las (A/S).

En las 5 Clases mayoritarias Prototr./TE 2 (6.9 %), Prototr./TE 25 (2.2 %), Prototr./TE 23 (7.7 %), Prototr./TE 24 (4.4 %) y Prototr./TE 40 (3.3 %), concentran el 28.5 de las cepas con serotipo IB, un porcentaje muy similar al observado en las 5 Clases principales (A/S).

Por otro lado, si nos fijamos en las 5 principales Clases (A/S), tras la aplicación de la electroforesis de isoenzimas, vemos que se reparten en 37 Clases (A/S/TE), lo que permitiría una mayor discriminación de las Clases (A/S) mayoritarias en el grupo de cepas con serotipo IB.

La escasa relación observada entre las Clases (A/S) y los TEs, ha sido observada por otros autores no solo en *N. gonorrhoeae* (Poh y cols., 1992), sino en otras especies como *N. meningitidis* (Caugant y cols., 1987; Berrón 1992).

Esta ausencia de correlación entre genotipos y fenotipos nos sugiere que puede ser interesante la combinación de ambos métodos con el fin de discriminar aislados de *N. gonorrhoeae*.

A la vista de los resultados obtenidos, pensamos que la electroforesis de isoenzimas podría servir como método de subtipado en aquellas cepas que presentan Clases (A/S) comunes.

La combinación de estos 3 métodos de tipificación nos llevaría a una designación de las cepas por Clases Auxotipo/Serovariedad y número de TE (A/S/TE).

..... **CONCLUSIONES**

El estudio presentado en esta memoria pretende conseguir un conocimiento más amplio de la especie *N. gonorrhoeae*, tanto desde el punto de vista fenotípico como genotípico. Para ello se han empleado los marcadores clásicos (auxotipia, determinación de serovariedades y plasmidotipia) así como la electroforesis de isoenzimas que nos ofrece una visión de la estructura y relaciones genéticas de la población de gonococos.

Así mismo se ha realizado un seguimiento de la sensibilidad a antimicrobianos de los aislamientos de gonococo, analizando el estado de sensibilidad frente a los antibióticos utilizados con mayor frecuencia en el tratamiento de la infección gonocócica (penicilina, tetraciclina, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona y espectinomicina) así como frente a algún otro (ciprofloxacina) que se presenta como una alternativa en el tratamiento de infecciones producidas por cepas resistentes a los antibióticos anteriormente citados.

Por otro lado se ha realizado un estudio de polimorfismo enzimático en un grupo de cepas NGPP aisladas en 1986 y 1987, todas ellas portadoras del plásmido de tipo africano, con el fin de analizar el cambio en el perfil plasmídico observado en estos años en el laboratorio de referencia de gonococos.

De los resultados obtenidos en el presente estudio podemos deducir las siguientes conclusiones:

1.- La clasificación obtenida al aplicar electroforesis de isoenzimas en las distintas especies del género *Neisseria* concuerda en general con los esquemas taxonómicos previamente establecidos. La especie más homogénea ha resultado ser *N. gonorrhoeae*, mientras que las más heterogéneas han sido *N. perflava/sicca* y *N. mucosa*.

2.- La especie *N. cuniculi*, ubicada por algunos autores junto con *N. caviae* y *N. ovis* como especies de afiliación incierta, se encuentra estrechamente relacionada con *N. polysaccharea*, *N. lactamica* y *N. cinerea*, por lo que podría ser incluida en el grupo de "verdaderas" neiserias.

Del estudio de sensibilidad a antimicrobianos llevado a cabo deducimos que:

3.- La proporción de cepas resistentes a penicilina, bien por producción de β -lactamasa o por mutación cromosómica es de un 24.5 %, con lo que este antibiótico no debe emplearse en el tratamiento de la infección gonocócica. El mismo problema se presenta con el uso de la tetraciclina, ya que un 56.6 % de los aislamientos fueron resistentes a este antibiótico.

4.- Las mutaciones cromosómicas responsables de la resistencia a penicilina confieren igualmente una disminución en la sensibilidad a cefalosporinas de segunda y tercera generación, así como a tetraciclina. No sucede lo mismo en el caso de la espectinomicina y ciprofloxacina.

5.- El empleo de la ciprofloxacina como tratamiento alternativo debe llevarse a cabo con precaución ya que hemos encontrado cepas con una CMI entre 0.06 y 0.25 $\mu\text{g/ml}$, consideradas como moderadamente resistentes.

Al aplicar los marcadores fenotípicos encontramos que:

6.- Hemos obtenido 22 auxotipos diferentes aunque el 81.9 % de las cepas se concentran tan solo en dos (Prototóficas y Prolina dependientes), lo que limita mucho su utilización como único marcador. Sin embargo observamos un ligero incremento del auxotipo -Pro, -Arg en detrimento del -Pro en los últimos años del estudio.

7.- El serotipo mayoritario ha sido el IB (74.6 %). Tras aplicar anticuerpos monoclonales para determinar serovariedades, las cepas IB presentan una mayor variabilidad que las cepas IA. En estas últimas la serovariedad mayoritaria fue IA/rst (47.9 %), seguida de IA/v (24.5 %). Las cepas IB se han distribuido en 83 serovariedades diferentes, destacando que las serovariedades IB/ys y IB/oys han experimentado un incremento importante en los últimos años.

8.- Hemos encontrado una clara asociación entre algunas serovariedades y la sensibilidad a antibióticos. Así, en el grupo de las Pen^r las Clases Prototr./IBoys, -Pro/IBrop y -Pro/IBopyvt son más abundantes que en el grupo de las Pen^s y Pen^m ($p < 0.01$); así mismo las cepas Prototro./IBoys y Prototr./IBys son más frecuentes en el grupo de las Tet^r ($p < 0.01$).

9.- A partir de 1986 se produce un cambio del perfil plasmídico en las cepas NGPP, siendo más frecuente a partir de ese momento el plásmido de tipo africano (3.2 Md), sí bien parece que existe una cierta tendencia a que se equilibre la frecuencia con el asiático (4.5 Md).

10.- A la vista de los resultados obtenidos tras aplicar la electroforesis de isoenzimas en cepas NGPP, pensamos que aislamientos Prototr./AvBx pudieran haber sido los responsables del cambio del perfil plasmídico. Este tipo de aislamientos no son tan frecuentes en la actualidad.

11.- Existe una correlación entre el aumento de cepas resistentes a tetraciclina y una mayor presencia del plásmido de 4.5 Md.

Del estudio de la electroforesis de isoenzimas en cepas no-NGPP con diferentes niveles de sensibilidad frente a antibióticos concluimos que:

12.- No se encuentra relación entre los marcadores fenotípicos (Auxotipo/Serovariedad) y los TEs. La información obtenida revela que los gonococos son un grupo genéticamente homogéneos que presenta una estructura de población clonal.

13.- Existe una clara relación entre algunos TEs y los niveles de sensibilidad frente a penicilina y/o tetraciclina.

14.- Parece que la resistencia ha aparecido en clones preexistentes en la población ya que no encontramos ningún clon constituido exclusivamente por cepas resistentes. Tanto la resistencia moderada a penicilina (CMI entre 0.12 y 0.5 $\mu\text{g/ml}$) como la resistencia a tetraciclina (CMI $> 1 \mu\text{g/ml}$) se encuentran ambas

ampliamente distribuidas en la población general. No sucede lo mismo con la resistencia frente a penicilina (CMI > 1 μ g/ml), que se presenta tan solo en algunos "cluster".

15.- Al aplicar conjuntamente auxotipos, determinación de serovariedades y análisis multienzimático se consigue llegar a una mayor caracterización de las cepas. Esto sería de una mayor utilidad en el caso de las cepas IA en las que la aplicación de los marcadores fenotípicos no consigue una alta discriminación.

16.- A la vista de los resultados obtenidos, podemos afirmar que la población de *N. gonorrhoeae* en España presenta una alta variabilidad con frecuentes cambios en los tipos de cepas más abundantes e incluso con la introducción de nuevos tipos.

..... BIBLIOGRAFIA

- . ACHTMAN M, M HEUZENROEDER, B KUSECEK, H OCHMAN, DA CAUGANT, RK SELANDER, V VAISANEN-RHEN, T KORHONEN, S STUART, F ORSKOV AND I ORSKOV (1986). Clonal analysis of O2:K1 *Escherichia coli* isolated from diseased human and animals. *Infect Immun*, 51: 268-276.
- . ANDERSON B, WL ALBRITTON, J BIDDLE ET AL (1984). Common β -lactamase-specifying plasmid in *Haemophilus ducreyi* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 25: 296-297.
- . APICELLA MA, MAJ WESTERINK, SA MORSE, H SCHNEIDER, PA RICE AND JM GRIFFISS (1986). Bactericidal antibody response of normal human serum to the lipooligosaccharide of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Infect Dis*, 153: 520-526.
- . APICELLA MA, M SHERO, GA JARVIS, JM GRIFFISS, RE MANDRELL AND H SCHNEIDER (1987). Phenotypic variation in epitope expression of the *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide. *Infect Immun*, 55: 1755.
- . AYALA FJ (1976). *Molecular evolution*. Sinauer Associates. Sunderland. Mass.
- . AYALA FJ (1982). *Biologie moléculaire et evolution*. Collection de Biologie évolutive. Masson, Paris.
- . AYALA FJ AND JW VALENTINE (1979). *Evolving: The theory and processes of organic evolution*. Benjamin/Cummings, Menlo Park, California.
- . BÄCKMAN M, A-K M RUDEN, SM BYGDEMAN, A JONSON, O RIGERTZ AND EG SANDSTRÖM (1985). Gonococcal serovar distribution in Stockholm with special reference to multiple infections and infected partners. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect, B* 93: 225-232.
- . BANSMER C AND J BREM (1948). Acute meningitis caused by *Neisseria sicca*. *N England J Med*, 238: 596.

- . BARO T, J GARCIA, C ALIA Y A GARCIA (1987). Penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* in a hospital in Barcelona, Spain. *Genitourin Med*, 63: 60-62.

- . BARO T, J GARCIA CONESA, JA VAZQUEZ, R MIRALLES Y C ALIA (1989). Estudio de la sensibilidad antimicrobiana, auxotipia, serotipia y análisis plasmídico de 75 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas en Barcelona. *Med Clin (Barc)*, 92: 765-768.

- . BATTEIGER BE AND RB JONES (1987). Chlamydial infections. *Infect Dis Clin North Am*, 1: 55-81.

- . BERRON S, A FENOLL Y JA VAZQUEZ (1988). Variaciones en el perfil plasmídico en cepas de *Neisseria gonorrhoeae* productoras de penicilinas. III Congreso Nacional de la SEIM. Granada.

- . BERRON S, JA VAZQUEZ Y A FENOLL (1988). Incidencia de *Chlamydia trachomatis* en infección genital en el área de Madrid. *Enf Infec y Microbiol Clin* 6: 186-189.

- . BERRON S, JA SAEZ Y JA VAZQUEZ (1992). Aplicación de marcadores epidemiológicos en cepas de *Neisseria meningitidis* con sensibilidad disminuida a penicilinas aisladas en España (1985-1990). *Rev Esp Quimioter*, 1: 35-41.

- . BISWAS GD, EY BLACKMAN AND PF SPARLING (1980). High-frequency conjugal transfer of a gonococcal penicillinase plasmid. *J Bacteriol*, 143: 1318-1324.

- . BLACK JR, WJ BLACK AND JG CANNON (1985). Neisserial antigen H8 is immunogenic in patients with disseminated gonococcal and meningococcal infections. *J Infect Dis*, 151: 650.

- . BLAKE MS AND EC GOTSCHLICH (1983). Gonococcal membrane proteins: speculation on their role in pathogenesis. *Prog Allergy*, 33: 298-313.

- . BOQUETE MT, C MARCOS AND JA SAEZ NIETO (1986). Characterization of *Neisseria polysaccharea* sp nov (Riou 1983) in previously identified noncapsular strains of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol*, 23: 973-975.

- . BOSLEGO JW, EC TRAMONT, ET TAKAFUJI, BM DINIEGA, BS MITCHELL, JW SMALL, WN KHAN AND DC STEIN (1987). Effect of spectinomycine use on the prevalence of spectinomycin-resistant and of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *N Engl Med*, 317:272.

- . BOVRE K, M FIANDT AND W SZYBALSKI (1969). DNA base composition of *Neisseria*, *Moraxella* and *Acinetobacter*, as determined by measurement of buoyant density of CsCl gradients. *Can J Microbiol*, 15: 335-338.

- . BOVRE K AND E HOLTEN (1970). *Neisseria elongata* sp. nov., a rod-shaped member of the genus *Neisseria*. Reevaluation of cell shape as a criterion in classification. *J Gen Microbiol*, 60: 67-75.

- . BOVRE K (1984). Family VIII. *Neisseriaceae* Prevot 1933, pgs 288-290. In N.R. Krieg and J.G. Holt (eds), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 1. The Williams & Wilkins Co, Baltimore.

- . BRANNIGAN JA, IA TIRODIMOS, Q-Y ZHANG, CG DOWSON AND BG SPRATT (1990). Insertion of an extra amino acid is the main cause of the low affinity of penicillin-binding protein 2 in penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Molec Microbiol*, 4: 913-919.

- . BRETT M (1989). A novel gonococcal β -lactamase plasmid. *J Antimicrob Chemother*, 23: 653-654.

- . BRITIGAN BE, MS COHEN AND PF SPARLING (1985). Gonococcal infections: a model of molecular pathogenesis. *N Engl Med*, 312: 1683-1694.

- . BUCHANAN TM (1975). Antigenic heterogeneity of gonococcal pili. *J Exp Med* 151: 1470.

- . BYGDEMAN S, D DANIELSSON AND E SANDSTRÖM (1981). Classification of *Neisseria gonorrhoeae* by coagglutination. A study of serological patterns in two geographical areas of Sweden. *Acta Dermato-Venereol*, 61: 423-427.

- . BYGDEMAN S, M BÄCKMAN, D DANIELSON AND M NORGREN (1982). Genetic linkage between serogroup specificity and antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect*, B90: 243-250.

- . BYGDEMAN SM, E-C GILLENUS AND EG SANDSTRÖM (1985). A comparison between two different sets of monoclonal antibodies for the serological classification of *Neisseria gonorrhoeae*. In *The pathogenic Neisseriae* (GK Schoolnik, G Brooks, S Falkow, JS Knapp, A McCutchan and S Morse, eds.). American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 31-36.

- . CANNON JG, WJ BLACK, I NACHAMKIN AND PW STEWART (1984). Monoclonal antibody that recognizes an outer membrane antigen common to the pathogenic *Neisseria* species but not to most nonpathogenic *Neisseria* species. *Infect Immun*, 43:994.

- . CANNON JG AND PF SPARLING (1984). The genetics of the gonococcus. *Ann Rev Microbiol*, 38: 111-113.

- . CASIN I, F PERENET, C ISSOIRE ET AL (1989). High level tetracycline resistance in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in France. *Europ J Clin Microbiol Infect Dis*, 8: 929-931.

- . CATLIN BW AND S CUNNINGHAM (1961). Transforming activities and base contents of deoxyribonucleate preparations from various neisseriae. *J Gen Microbiol*, 26: 303-312.

- . CATLIN BW (1973). Nutritional profiles of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in chemically defined media and the use of growth requirements for gonococcal typing. *J Infect Dis*, 128: 178-194.

- . CAUGANT DA, K BOVRE, P GAUSTAD, K BRYN, E HOLTEN, EA HOIBY AND LO FROHOLM (1986). Multilocus genotypes determined by enzyme electrophoresis of *Neisseria meningitidis* isolated from patients with systemic disease and from healthy carriers. *J Gen Microbiol*, 132: 641-652

- . CAUGANT DA, LF MOCCA, CE FRASCH, LO FROHOLM, WD ZOLLINGER AND RK SELANDER (1987). Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype and outer membrane protein pattern. *J Bacteriol*, 169: 2781-2792.

- . CENTERS FOR DISEASE CONTROL (1972). Recommended treatment schedules for gonorrhoea-March 1972. *MMWR* 21: 82.

- . CENTERS FOR DISEASES CONTROL (1987). Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*-United States. *MMWR*, 36: 107.

- . CENTERS FOR DISEASE CONTROL (1987). Antibiotic-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*: policy guidelines for detection, management, and control. *MMWR*, 36 (suppl): 1S-18S.

- . CENTER FOR DISEASES CONTROL (1990). 1989 Sexually transmitted diseases treatment guideline. In Holmes KK, PA Mardh, PF Sparling et al., eds. *Sexually Transmitted Diseases (Second Edition)*. McGraw Hill Inc., New York, A1-A22.

- . CHUNG PK, GF SENSABAUGH AND NA VEDROS (1985). Genetic relationships among *Neisseria* species assessed by comparative enzyme electrophoresis. *J Gen Microbiol*, 131: 3105-3115.

- . CLARK VL, LA CAMPBELL, DA PALERMO, TM EVANS AND KW KLIMPEL (1987). Induction and repression of outer membrane proteins by anaerobic growth of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun*, 55: 1359.

- . CRIDER SR, SD COLBY, LK MILLER, WO HARRISON, SBJ KERBS AND SW BERG (1984). Treatment of penicillin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* with oral norfloxacin. *N Engl J Med*, 311: 137.

- . DALLABETTA GA AND EW III HOOK (1989). Treatment of sexually-transmitted diseases with quinolone antimicrobial agents. In Wolfson JS and DC Hooper (eds.). *Quinolone Antimicrobial Agents*, Washington, DC, American Society for Microbiology, pag 125.

- . DANIELSSON D AND G KRONVALL (1974). Slide agglutination method for the serological identification of *Neisseria gonorrhoeae* with anti-gonococcal antibodies adsorbed to protein A containing staphylococci. *Appl Microbiol*, 27: 368-374.

- . DILLON JR, SM BYGDEMAN AND EG SANDSTRÖM (1987). Serological ecology of *Neisseria gonorrhoeae* (PPNG and nonPPNG): A Canadian perspective. *Genitourin Med*, 63: 160.

- . DILLON JR, M CARBALLO AND M PAUZE (1988). Evaluation of eight methods for identification of pathogenic *Neisseria* species: *Neisseria*-Kwik, RIM-N, Gonobio-Test, Minitex, Gonocheck II, Gonogen, Phadebact Monoclonal GC OMNI Test and Syva MicroTrak Test. *J Clin Microbiol*, 26: 493-497.

- . DILLON JR AND M CARBALLO (1990). Molecular epidemiology and novel combinations of auxotype, serovar, and plasmid content in tetracycline-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Canada. *Can J Microbiol*, 36: 64-67.

- . DOYLE RJ, F NEDJAT-HAIEM, KF KENNRTH AND CE FRASCH (1984). Diagnostic value of interactions between members of the family *Neisseriaceae* and lectins. *J Clin Microbiol*, 19: 383-387.
- . DOSSETT JH, PC APPELBAUM AND JS KNAPP ET AL (1985). Proctitis associated with *Neisseria cinerea* misidentified as *Neisseria gonorrhoeae* in a child. *J Clin Microbiol*, 21: 575-577.
- . ELWELL LP, M ROBERTS, LW MAYER ET AL (1977). Plasmid-mediated beta-lactamase production in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 11: 528-533.
- . EMBDEN JDA van, M DESSENS-KROON AND B van KLINGEREN (1985). A new β -lactamase plasmid in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother*, 15: 247-250.
- . FAINSTAIN V, DM MUSER AND EJ YOUNG (1978). Purulent pericarditis due to *Neisseria mucosa*. *Chest*, 74: 476.
- . FAUR YC, ME WILSON AND PS MAY (1981). Isolation of *N. meningitidis* from patients in a gonorrhea screening program: A four-year survey in New York city. *Am J Public Health*, 71: 53.
- . FEKETE T, DA SERFASS, SC LAFREDO AND KR CUNDY (1989). Susceptibility to cephalosporins of penicillin-susceptible and penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* from Philadelphia. *Antimicrob Agents Chemother*, 33: 164-166.
- . FENOLL A, S BERRON Y JA VAZQUEZ (1987). Analysis of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* (PPNG) isolated in Madrid (Spain) from 1983-1985. *Epidemiol Infect*, 99: 455-462.
- . GASCOYNE DM, J HERITAGE AND P HAWKEY (1990). The 25.2 MDa tetracycline-resistance plasmid is not derived from the 24.5 MDa

- conjugative plasmid of *Neisseria gonorrhoeae*. J Antimicrob Chemother, 25: 39-47.
- . GAY RM AND RE SEVIER (1978). *Neisseria sicca* endocarditis: Report of a case and review of the literature. J Clin Microbiol, 8: 729.
- . GOLD R, I GOLDSCHNEIDER, ML LEWPO, TF DRAPER AND M RANDOLPH (1978). Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in infants and children. J Infect Dis, 137: 112-121.
- . GOUBY A, G BOURG AND M RAMUZ (1986). Previously undescribed 6.6 kilobase R plasmid in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob Agents Chemother 29: 1095-1097.
- . GRANSDEN WR, C WARREN AND I PHILLIPS (1991). 4-Quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in the United Kingdom. J Med Microbiol, 34: 23-27.
- . GRIFFISS JM, H SCHNEIDER, RE MANDRELL, R YAMASAKI, GA JARVIS, JJ KIM, BW GIBSON, R HAMADEH AND MA APICELLA (1988). Lipooligosaccharides: The principal glycolipids of the neisserial outer membrane. Rev Infect Dis, 10. 5287.
- . HAMES BD (1990). One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In Gel electrophoresis of proteins. A practical approach (BD Hames and D Rickwood, eds.). The practical approach Series, pp 1-139.
- . HANDSFIELD HH (1990). *Neisseria gonorrhoeae*. In Mandell GL, RG Douglas and JE Bennett (eds.). Principles and practice of Infectious Diseases. Third Edition. pg 1613-1631.
- . HENDLEY JO, KR POWELL, NL SALOMONSKY AND RR RODEWALD (1981). Electron microscopy of the gonococcal capsule. J Infect Dis, 143: 796-802.
- . HENNESSEY R, JH REINHART AND MB McGUICKIN (1981). Endocarditis caused

- by *Neisseria mucosa* in a patient with a prosthetic heart valve. *Am J Med Technol*, 47: 909.
- . HERBERT DA AND J RUSKIN (1981). Are the " nonpathogenic" *neisseriae* pathogenic?. *Am J Clin Pathol*, 75: 739.
- . HOKE C AND NA VEDROS (1982). Taxonomy of the *Neisseria*: Deoxyribonucleic acid base composition, interspecific transformation, and deoxyribonucleic acid hibridization. *Int J system Bact*, 32: 57-66.
- . HOLLIS GD (1973). Sources of *Neisseria lactamicus*. *Lancet*, I: 1010.
- . HOLTEN, E (1974). Immunological comparison of NADP-dependent glutamate dehydrogenase and malate dehydrogenase in genus *Neisseria*. *Act Pathol Microbiol Scand*, B82: 849-859.
- . HOOK EW AND KK HOLMES (1985). Gonococcal infection. *Ann Intern Med*, 102: 229-243.
- . HOOK III EW AND HH HANDSFIELD (1990). Gonococcal infections in the adult. In Holmes KK, P-A Mardh, PF Sparling, PJ Wiesner, W Cates, SM Lemon and WE Stamm (eds.). *Sexually Transmitted diseases*, pag 149-165.
- . ISON CA, J GEDNEY AND CSF EASMON (1987). Chromosomal resistance of gonococci to antibiotics. *Genitourin Med*, 63: 239-243.
- . ISON CA, KM BINDAYNA, N WOODFORD, MJ GILL AND CSF EASMON (1990). Penicillin and cephalosporin resistance in gonococci. *Genitourin Med* 66: 351-356.
- . JAMES JF AND J SWANSON (1977). The capsule of the gonococcus. *J Exp Med*, 145: 1082-1086.
- . JOYCE MP, BB AYING, GH VAUGHAN ET AL (1988). In vitro sensitivity of

Neisseria gonorrhoeae to quinolone antibiotics in the Republic of the Philippines. Sixth International Pathogenic *Neisseria* Conference, Atlanta, GA; Abstract E19.

- . KELLOGG DS, WL PEACOK, WE DEACON, L BROWN AND CI PIRKLE (1963). *Neisseria gonorrhoeae*: 1. Virulence genetically linked to clonal variation. *J Bacteriol*, 85:1274-1279.
- . KINGSBURY DT (1967). Deoxyribonucleic acid homologies among species of the genus *Neisseria*. *J Bacteriol*, 94: 870-874.
- . KNAPP JS AND KK HOLMES (1975). Disseminated gonococcal infection caused by *Neisseria gonorrhoeae* with unique nutritional requirements. *J Infect Dis*, 132: 204-208.
- . KNAPP JS, PA TOTTEN, MH MULKS AND BH MINSHEW (1984 a). Characterization of *Neisseria cinerea*, a nonpathogenic species isolated on Martin-Lewis medium selective for pathogenic *Neisseria* spp. *J Clin Microbiol*, 19: 63-67.
- . KNAPP JS, MR TAM, RC NOWINSKI, KK HOLMES AND E SANDSTRÖM (1984b). Serological classification of *Neisseria gonorrhoeae* with use of monoclonal antibodies to gonococcal outer membrane protein I. *J Infect Dis*, 150: 44-48.
- . KNAPP JS AND EW HOOK III (1988). Prevalence and persistence of *Neisseria cinerea* and other *Neisseria* spp. in adults. *J Clin Microbiol*, 26: 896-900.
- . KNAPP JS, JM ZENILMAN AND SE THOMPSON (1990). Gonorrhoea. In SA Morse, AA Moreland and SE Thompson (eds.). *Atlas of Sexually Transmitted Diseases* pg 5.3.
- . LIND I, M ARBORIO, MW BENTZON, Y BUISSON, M GUIBOURDENCHE, K REIMANN AND J-Y RIOU (1991). The epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Dakar, Sénégal 1982-1986: antimicrobial

resistance, auxotypes and plasmid profiles. *Genitourin Med*, 67: 107-113.

- . MAHONEY JF ET AL (1943). The use of penicillin sodium in the treatment of sulfonamide-resistant gonorrhoea in men. A preliminary report. *Am J Gonorr Vener Dis*, 27: 525.
- . MAVROMMATI L, E TZELEPI, A SIMA, G TZANAKAKI, A KOKLA AND A FLEMETAKIS (1988). Antibiotic resistance, plasmid content and auxotypes of *Neisseria gonorrhoeae* in Greece. *J Antimicrob Chemother*, 21: 571-579.
- . MCGEE ZA, AP JOHNSON AND D TAYLOR-ROBINSON (1981). Pathogenic mechanisms of *Neisseria gonorrhoeae*: observations on damage to human fallopian tubes in organ culture by gonococci type 1 o type 4. *J Infect Dis*, 143: 413-422.
- . MIETZNER TA, GH LUGINBUHL, E SANDSTRÖM AND SA MORSE (1984). Identification of an iron-regulated 37.000 daltons protein in the cell envelope of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun*, 45: 410.
- . MOBERG I (1975). Auxotyping of gonococcal isolates, in *Genital infections and Their Complications*, D Danielsson et al (eds). Stockholm, Almqvist & Wiksell International, p 271.
- . MONAYAR HK, A LEDESMA, V NOVILE AND JA VIARENGO (1987). Epidemiology and treatment of uncomplicated gonorrhoea caused by non-PPNG strains in Cordoba, Argentina: auxotypes susceptibility profiles, and plasmid analyses of urethral isolates from men. *Genitourin Med*, 63: 246-249.
- . MORELLO JA AND M BONHOFF (1980). *Neisseria* and *Branhamella*. In EH Lennette, A Balows, WJ Hausler and JP Truant (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, pgs 111-130. ED ASM Washington DC.
- . MORSE SA, SR JOHNSON, JW BIDDLE AND MC ROBERTS (1986). High-level

tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is result of acquisition of streptococcal tetM determinant. *Antimicrob Agents Chemother*, 30: 664-670.

- . MULKS MH AND AG PLANT (1978). IgA protease production as a characteristic distinguishing pathogenic from harmless *Neisseriaceae*. *N England J Med*, 299: 973.
- . MUSSER JM, EL HEWLETT, MS PEPPLER AND RK SELANDER (1986). Genetic diversity and relationship in populations of *Bordetella* spp.. *J Bacteriol*, 166: 230-237.
- . NEI M (1975). *Molecular polymorphism and evolution*. North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- . NEI M (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small sample of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- . NEWHALL WJ, WD SAWYER AND RA HAAK (1980). Crosslinking analysis of the outer membrane proteins of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun*, 28: 785.
- . NOEGEL A AND EC GOTSCHLICH (1983). Isolation of high molecular weight polyphosphate from *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med*, 157: 2049.
- . NOGUEIRA JM, JC PALOMARES Y JA VAZQUEZ (1990). *Epidemiología del gonococo en España*. *Rev Iberoam Enf Transm Sex*, 10: 9-15.
- . OCHMAN H, TS WHITTAM, DA CAUGANT AND RK SELANDER (1983). Enzyme polymorphism and genetic population structure in *Escherichia coli* and *Shigella*. *J Gen Microbiol*, 129: 2715-2726.
- . PEREA EJ, JL GARCIA-LOPEZ, R MARTIN, M CLAMET, R CISTERNA, V ESTEBANEZ, JA VAZQUEZ, F MARTIN LUENGO, A ALTUNA, C MERINO Y A RODRIGUEZ TORRES (1991). Sensibilidad a antimicrobianos de 402

cepas de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas en 7 ciudades de España. *Enf Infecc y Microbiol Clin*, 9: 619-623.

- . PEREZ JL, MD GARCIA Y R MARTIN (1989). *Neisseria* spp. Nuevos aspectos microbiológicos. *Enf Infecc Microb Clin*, 10: 53-60.

- . PERINE PL, C THORNSBERRY, W SCHALLA, J BIDDLE, MS SIEGEL, HK WONG AND SE THOMPSON (1977). Evidence for two distinct types of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Lancet*, ii: 993-995.

- . PHILLIPS I (1976). Beta-lactamase producing, penicilin-resistant gonococcus. *Lancet*, 2: 656.

- . PISTOLE TG (1981). Interaction of bacteria and fungi with lectins and lectin-like substances. *Ann Rev Microbiol*, 35: 85-112.

- . POH CL, JC OCAMPO AND GK LOH (1992). Genetic relationships among *Neisseria gonorrhoeae* serovars analysed by multilocus enzyme electrophoresis. *Epidemiol Infect*, 108: 31-38.

- . PRENTICE AW (1957). *Neisseria flavescens* as a cause of meningitis. *Lancet*, 1: 613.

- . RICE RJ, JW BIDDLE, YA JEANLOUIS, WE DE WITT, JH BLOUNT AND SA MORSE (1986). Chromosomally mediated resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the United States: results of surveillance and reporting, 1983-1984. *J Infect Dis*, 153: 340-345.

- . RIOU JY, M GUIBOURDENCHE AND MY POPOFF (1983). A new taxon in the genus *Neisseria*. *Ann Microbiol (París)*, 134: 257-267.

- . RIOU JY AND M GUIBOURDENCHE (1987). *Neisseria polysaccharea* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 37: 163-165.

- . ROBERTS M AND S FALKOW (1977). Conjugal transfer of R plasmid in *Neisseria gonorrhoeae*. *Nature*, 266: 630-631.
- . ROBERTS M, P PIOT AND S FALKOW (1979). The ecology of gonococcal plasmid. *J Gen Microbiol*, 114: 491-494.
- . ROBERTS MC AND JS KNAPP (1988). Transfer of β -lactamase plasmid from *Neisseria gonorrhoeae* to *Neisseria meningitidis* and comensal *Neisseria* species by the 25.2-megadalton conjugative plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 32: 1430-1432.
- . SAEZ NIETO JA, A FENOLL, JA VAZQUEZ AND J CASAL (1982). Prevalence of maltose-negative *Neisseria meningitidis* variants during an epidemic period in Spain. *J Clin Microbiol*, 15: 78-81.
- . SANDSTRÖM E AND D DANIELSSON (1980). Serology of *Neisseria gonorrhoeae*: Classification with coagglutination. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect, B* 88: 27-38.
- . SANDSTRÖM E, KCS CHEN AND TM BUCHANAN (1982). Serology of *Neisseria gonorrhoeae*. Coagglutination serogroups WI and WII/III correspond to different outer membrane protein I molecules. *Infect Immun*, 38: 462-470.
- . SANDSTRÖM E, P LINDELL, B HARFEST, F BLOMBERG, A-C RYDEN AND S BYGDEMAN (1985). Evaluation of a new set of *Neisseria gonorrhoeae* serogroup W-specific monoclonal antibodies for serovar determination. In *The pathogenic Neisseriae* (GK Schoolnik, G Brooks, S Falkow, JS Knapp, A McCutchan and S Morse, eds.). American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 26-30.
- . SCHALLA WO, WL WHITTINGTON, RJ RICE AND SA LARSEN (1985). Epidemiological characterization of *Neisseria gonorrhoeae* by lectins. *J Clin Microbiol*, 22: 379-382.

- . SCHWARCZ SK, JM ZENILMAN, D SCHNELL, JS KNAPP, EW HOOK III, S THOMPSON, FN JUDSON, KK HOLMES (1990). National surveillance of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *JAMA*, 11: 1413-1417.

- . SCHOOLNIK GK, R FERNANDEZ, JY TAI, J ROTHBARD AND EC GOTSCHLICH (1984). Gonococcal pili: primary structure and receptor binding domain. *J Exp Med*, 159. 1351-1370.

- . SCOTT RM (1971). Bacterial endocarditis due to *Neisseria flava*. *J Pediatr*, 78: 673.

- . SELANDER RK, RM MCKINNEY, TS WHITTAM, WF BIBB, DJ BRENNER, FS NOLTE AND PE PATTISON (1985). Genetic structure of populations of *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol*, 163: 1021-1037.

- . SELANDER RK, DA CAUGANT, H OCHMAN, JM MUSSER, MN GILMOUR AND TS WHITTAM (1986). Methods of Multilocus Enzyme Electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol*, 51: 873-884.

- . SPARLING PF (1978). Antibiotic resistance in the gonococcus. In RB ROBERTS (ed.). *The gonococcus*, New York, Wiley, pag 111.

- . SWANSON J (1982). Colony opacity and protein II compositions of gonococci. *Infect Immun*, 37: 359-368.

- . TAM MR, TM BUCHANAN, EG SANDSTRÖM, KK HOLMES, JS KNAPP, AW SIADAK AND RC NOVINSKI (1982). Serological classification of *Neisseria gonorrhoeae* with monoclonal antibodies. *Infect Immun*, 36: 1042-1053.

- . TARTAGLIONE TA AND ME RUSSO (1990). Pharmacology of drugs used in venereology. In Holmes KK, P-A Mard , PF Sparling, PJ Wiesner, W Cates, SM Lemon and WE Stamm (eds.). *Sexually transmitted diseases* pag 993.

- . TELFER BRUNTON WA, H YOUNG AND DRK FRASER (1980). Isolation of *Neisseria lactamica* from the female genital tract. A case report. Br J Ven Dis, 56: 325.
- . TURNER A, AE JEPHCOTT, TC HAJI AND PC GUPTA (1990). Ciprofloxacin resistant *Neisseria gonorrhoeae* in the UK. Genitourin Med, 66: 43-46.
- . VAN KLINGEREN B, MC ANSINK-SCHIPPER, M DESSENS-KROON AND M VERHEUVEL (1985). Relationship between auxotype, plasmid pattern and susceptibility to antibiotics in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. J Antimicrob Chemother, 16: 143-147.
- . VAN KLINGEREN B, MC ANSINK-SCHIPPER, L DOORNBOS, AS LAMPE, JHT WAGENVOORT, M DESSENS-KROON AND M VERHEUVEL (1988). Surveillance of the antibiotic susceptibility of non-penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* in the Netherlands from 1983 to 1986. J Antimicrob Chemother, 21: 737-744.
- . VAN KLINGEREN B, M DESSENS-KROON AND M VERHEUVEL (1989). Increased tetracycline resistance in gonococci in the Netherlands. Lancet, ii:1278.
- . VAZQUEZ JA AND S BERRON (1990). Lectins agglutination test as an epidemiological marker for *Neisseria gonorrhoeae*. Genitourin Med, 66: 302-305.
- . VAZQUEZ JA (1991). Infección gonocócica. Informe del laboratorio de ETS (CNMVIS). Años 1983-1990. B.M.S. 25/1991 pag 1-3.
- . WEST SEH AND PF SPARLING (1985). Response of *Neisseria gonorrhoeae* to iron limitation: Alterations in expression of membrane proteins without apparent siderophore production. Infect Immun, 47: 388.
- . WAUGH MA, CJN LACEY, PM HAWKEY, J HERITAGE, A TURNER AND AE JEPHCOTT (1988). Spread of *Neisseria gonorrhoeae* resistant to

tetracycline outside the United States of America. *Br Med J*, 296: 898.

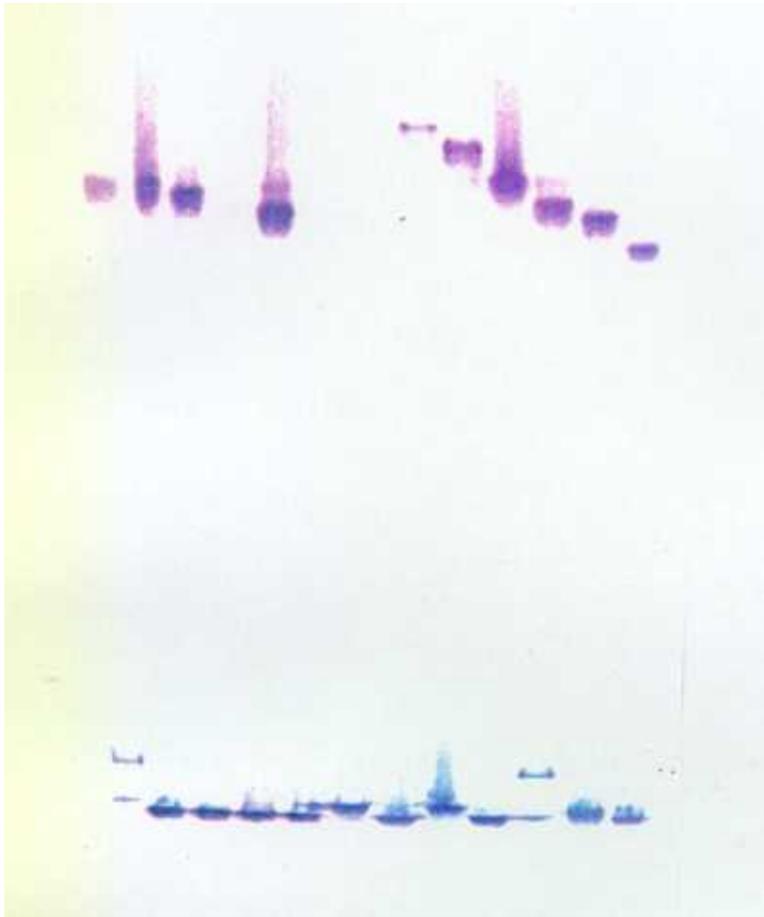
- . WITE LA, DS KELLOGG (1965). *Neisseria gonorrhoeae* identification in direct smears by a fluorescent antibody counterstain method. *Appl Microbiol*, 13: 171.

- . WHITTINGTON WL AND JS KNAPP (1988). Trends in resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial agents in the United States. *Sex Trans Dis*, 15: 202-210.

- . YEUNG K-D, JR DILLON, M PAUZE AND E WALLACE (1986). A novel 4.9 kilobase plasmid associated with an outbreak of penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae*. *J Infect Dis*, 153: 1162-1165.

- . YOUNG H AND A McMILLAN (1982). Rapidity and reliability of gonococcal identification by coagglutination after culture on modified New York City medium. *Br J Vener*, 58: 109-112.

..... **APENDICE**



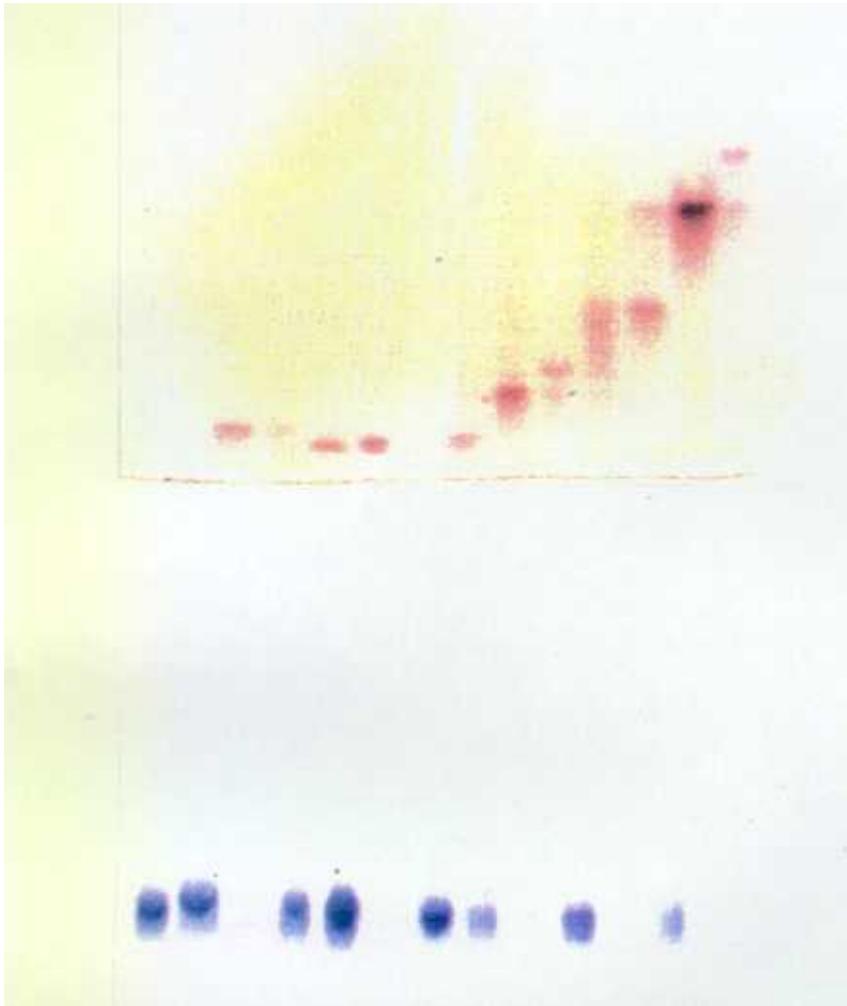
Fotografía superior.- Actividad del enzima Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa. De izquierda a derecha: 1) *N. polysaccharea*, 2) *N. cinerea*, 3) *N. gonorrhoeae*, 4) *N. lactamica*, 5) *N. mucosa*, 6) *N. perflava/sicca*, 7) *N. subflava*, 8) *N. perflava/sicca*, 9) *N. meningitidis*, 10) *N. gonorrhoeae*, 11) *N. cinerea*, 12) *N. lactamica*, 13) *N. meningitidis*.

Fotografía inferior.- Actividad del enzima Glutamato deshidrogenasa (NADP). De izquierda a derecha: 1) *N. mucosa*-*N. N.cinerea*, 2) 3) 4) 5) *N. gonorrhoeae*, 6) *N. meningitidis*, 7) *N. gonorrhoeae*, 8) *N. perflava/sicca*, 9) *N. gonorrhoeae*, 10) *N. lactamica*, 11) *N. polysaccharea*, 12) *N. gonorrhoeae*.



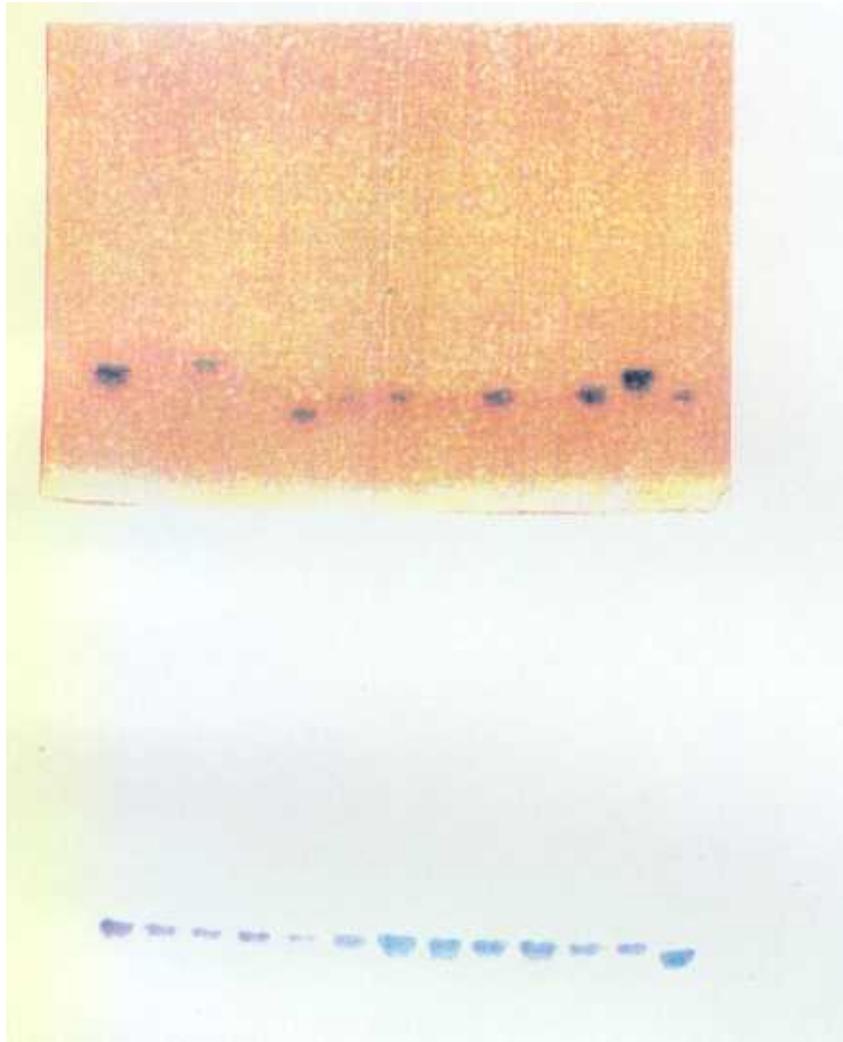
Fotografía superior.- Actividad del enzima Isocitrato deshidrogenasa. De izquierda a derecha. 1) *N. perflava/sicca*, 2) *N. polysaccharea*, 3) *N. lactamica*, 4) *N. meningitidis*, 5) *N. mucosa*, 6) *N. cinerea*, 7) *N. polysaccharea*, 8) *N. meningitidis*, 9) *N. cuniculi*, 10) *N. gonorrhoeae*, 11) *N. perflava/sicca*, 12) *N. lactamica*.

Fotografía inferior.- Actividad del enzima Enzima málico. De izquierda a derecha: 1) *N. cinerea*, 2) *N. meningitidis*, 3) *N. mucosa*, 4) *N. cinerea*, 5) *N. perflava/sicca*, 6) *N. cuniculi*, 7) *N. denitrificans*, 8) *N. gonorrhoeae*, 9) *N. lactamica*, 10) *N. subflava*, 11) *N. perflava/sicca*, 12) *N. mucosa*.



Fotografía superior.- Actividad del enzima Fosfatasa alcalina. De izquierda a derecha: 1) *N. perflava/sicca*, 2) *N. elongata*, 3) *N. lactamica*, 4) *N. gonorrhoeae*, 5) *N. polysaccharea*, 6) *N. cinerea*, 7) *N. mucosa*, 8) *N. mucosa*, 9) *N. flava*, 10) *N. denitrificans*, 11) *N. perflava/sicca*.

Fotografía inferior.- Actividad del enzima Alcohol deshidrogenasa. De izquierda a derecha: 1) 2) *N. polysaccharea*, 3) 4) 5) *N. lactamica*, 6) 7) *N. gonorrhoeae*, 8) 9) *N. meningitidis*, 10) *N. lactamica*, 11) *N. polysaccharea*, 12) *N. gonorrhoeae*.



Fotografía superior.- Actividad del enzima Glutámico-oxalacético transaminasa. De izquierda a derecha: 1) 2) *N. gonorrhoeae*, 3) *N. cinerea*, 4) 5) *N. lactamica*, 6) *N. polysaccharea*, 7) *N. perflava/sicca*, 8) *N. mucosa*, 9) *N. flava*, 10) *N. denitrificans*, 11) *N. perflava/sicca*, 12) *N. elongata*, 13) *N. subflava*.

Fotografía inferior.- Actividad del enzima Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa. Cepas de *N. gonorrhoeae*.



Fotografía superior.- Actividad del enzima Glutamato deshidrogenasa (NADP).
Cepas de *N. gonorrhoeae*.

Fotografía inferior.- Actividad del enzima Fosfatasa alcalina. Cepas de *N. gonorrhoeae*.