

ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO Y RESISTENCIA A AGENTES ANTI-
MICROBIANOS DE NEISSERIA GONORRHOEAE EN SEVILLA.

Trabajo realizado en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, para optar al grado de Doctor, por la licenciada D^a M^a del Carmen Lozano Domínguez.

Sevilla, Septiembre 1.988



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE BIOLOGIA

D. ANTONIO TORRES RUEDA, Jefe y Catedrático del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla:

C E R T I F I C A:

Que D^a M^a DEL CARMEN LOZANO DOMINGUEZ ha realizado la Tesis Doctoral: " ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO Y RESISTENCIA A AGENTES ANTIMICROBIANOS DE NEISSERIA GONORRHOEAE EN SEVILLA ", bajo la Dirección del Prof. Evelio J. Perea Pérez, Catedrático del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla y que reúne las condiciones necesarias para su lectura.

Sevilla, 7 de Septiembre de 1.988

Antonio Torres



Fdo. D. Antonio Torres



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

CATEDRATICO JEPE DEPARTAMENTO

PROF. EVELIO J. PEREA

PROFESORES TITULARES

M.^a VICTORIA BOROBIO
JOSE C. PALOMARES
JAVIER AZNAR

PROF. EVELIO J. PEREA PEREZ, Catedrático de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de Sevilla, como Director, PROF. JOSE CARLOS PALOMARES FOLIA, Profesor Titular de dicha Cátedra, y PROF. RAUL CANO CHAUVELL, Profesor de Microbiología de California Polytechnic State University de Estados Unidos como Codirectores,

CERTIFICAMOS:

Que D^a M^a DEL CARMEN LOZANO DOMINGUEZ, ha realizado bajo nuestra dirección la Tesis Doctoral titulada: "ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO Y RESISTENCIA A AGENTES ANTIMICROBIANOS DE NEISSERIA GONORRHOEAE EN SEVILLA", y que reúne las condiciones necesarias para su lectura.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Sevilla a seis de Septiembre de mil novecientos ochenta y ocho.

Fdo: Prof. E.J. Perea

Fdo: Prof. José C. Palomares

Fdo: Prof. Raul. Cano

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Evelio J. Perea, Director de esta Tesis quien con su inapreciable apoyo y valiosos consejos la ha hecho posible.

Al Dr. Jose Carlos Palomares, Codirector de la misma, por su dedicación y ayuda inestimable en todo el proceso de desarrollo y elaboración del presente trabajo.

Al Prof. Raul J. Cano por su confianza depositada en mi, sus sugerencias y orientaciones en el aspecto técnico de este estudio.

A todos mis compañeros de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Medicina de Sevilla, en especial a Mercedes Lomas y a M^a José Torres quienes en todo momento me dieron su apoyo y el estímulo necesario para concluir este estudio.

Y a todos los que de un modo u otro me han ayudado a su consecución.

Gracias a todos.

INDICE

	Página
INTRODUCCION.....	2
MATERIALES.....	11
1.- POBLACION BACTERIANA.....	11
2.- PRODUCTOS.....	11
2.1.- Químicos y biológicos.....	13
2.2.- Agentes antimicrobianos.....	15
3.- TAMPONES Y SOLUCIONES.....	17
4.- MEDIOS DE CULTIVO Y CONSERVACION.....	27
4.1.- Medio sólido de crecimiento para <u>N. gonorrhoeae</u>	27
4.2.- Medio líquido de crecimiento para <u>N. gonorrhoeae</u>	28
4.3.- Medio líquido de crecimiento para <u>E. coli</u>	28
4.4.- Medio para la determinación de la auxotipia.....	28
4.5.- Medio sólido de crecimiento de <u>N. gonorrhoeae</u> para la de- terminación del serotipo.....	37
4.6.- Medio para el diagnóstico bio- químico de <u>N. gonorrhoeae</u>	37
4.7.- Medio para la determinación de la sensibilidad de <u>N. gonorrhoeae</u> ...	38
4.8.- Medio para la determinación de la sensibilidad de <u>E. coli</u>	38
4.9.- Medio para la conservación y almacenamiento de <u>N. gonorrhoeae</u>	38
METODOS.....	41
1.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACION.....	41
1.1.- Aislamiento.....	41
1.2.- Identificación.....	42
2.- DETERMINACION DE LA PRODUCCION DE PENICILINASA.....	43

3.- DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	44
4.- DETECCION DE PLASMIDOS Y CALCULO DE SUS PESOS MOLECULARES.....	48
4.1.- Método de Kado y Liu.....	48
4.2.- Método de lisis alcalina de Birnboim y Doly modificada por Horowicz.....	50
4.3.- Método de Eckhardt.....	53
5.- DETERMINACION DE LOS REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES O AUXOTIPIA.....	53
6.- REALIZACION DE LA SEROGRUPACION Y SEROTIPIA.....	56
7.- AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL ADN.....	59
7.1.- AISLAMIENTO DEL ADN.....	59
7.1.1.- Método de Cornelis y cols.....	59
7.1.2.- Método de lisis alcalina de Birnboim y Doly modificada por Horowicz.....	61
7.2.- PURIFICACION DEL ADN POR GRADIENTE DE DENSIDAD DE CLORURO DE CESIO CON BROMURO DE ETIDIO.....	62
8.- EXTRACCION DE LOS PLASMIDOS DEL GEL DE AGAROSA.....	63
- Método de congelación-descongelación.....	64
- Método de electroelución por electroforesis vertical.....	65
- Método de electroelución mediante membrana de diálisis.....	66
9.- TRATAMIENTO DE LOS PLASMIDOS CON ENZIMAS DE RESTRICCION.....	69
10.- TRANSFORMACION DE <u>E. COLI</u> CON ADN PLASMIDICO.....	70
11.- ESTUDIOS DE HIBRIDACION DEL ADN PLASMIDICO.....	72

11.1.- Hibridación directa a partir de una solución de ADN.....	73
11.2.- Hibridación usando el método de Southern blot.....	76
12.- ESTUDIOS ESTADISTICOS.....	79
RESULTADOS.....	81
1.- PRODUCCION DE PENICILINASA.....	82
2.- DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	82
3.- DETECCION DE PLASMIDOS Y CALCULO DE SUS PESOS MOLECULARES.....	87
4.- DETERMINACION DE LOS REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES O AUXOTIPIA.....	91
5.- DETERMINACION DEL SEROGRUPO Y SEROTIPOS.....	93
6.- RELACION PLASMIDOS/SENSIBILIDAD.....	99
7.- RELACION PLASMIDOS/AUXOTIPIA.....	99
8.- RELACION PLASMIDOS/SEROGRUPOS.....	101
9.- RELACION SENSIBILIDAD/AUXOTIPIA.....	101
10.- RELACION SENSIBILIDAD/SEROGRUPOS.....	102
11.- RELACION AUXOTIPIA/SEROGRUPOS.....	102
12.- RELACION SENSIBILIDAD/SEXO/PREFERENCIA SEXUAL.....	106
13.- RELACION PLASMIDOS/SEXO/PREFERENCIA SEXUAL.....	106
14.- RELACION AUXOTIPIA/SEXO/PREFERENCIA SEXUAL.....	106
15.- RELACION SEROGRUPO/SEXO/PREFERENCIA SEXUAL.....	106
16.- SEGUIMIENTO EPIDEMIOLOGICO DE CONTACTOS MEDIANTE LA DETERMINACION DE PLASMIDOS, AUXOTIPIA Y SEROTIPIA.....	112
17.- ESTUDIO GENETICO DE LA CEPA 34/85.....	117
DISCUSION.....	127
1.- PRODUCCION DE PENICILINASA.....	129

	Página
2.- SENSIBILIDAD A AGENTES ANTI-MICROBIANOS.....	131
3.- DETECCION DE PLASMIDOS Y CALCULO DE SUS PESOS MOLECULARES.....	138
4.- DETERMINACION DE LOS REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES O AUXOTIPIA.....	147
5.- DETERMINACION DEL SEROGRUPO Y SEROTIPOS.....	156
6.- ESTUDIO GENETICO DE LA CEPA 34/85.....	169
CONCLUSIONES.....	176
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	181

INTRODUCCION

Neisseria gonorrhoeae (N. gonorrhoeae) es un microorganismo patógeno cuyo reservorio es única y exclusivamente la especie humana (1). En el hombre se ha descrito toda una gama de infecciones ocasionadas por esta bacteria, que van desde las urogenitales no complicadas hasta las complicadas; entre estas últimas se incluyen: la enfermedad inflamatoria pélvica (que puede producir esterilidad), la infección gonocócica diseminada, epididimitis, proctitis, etc.

A diferencia de otras bacterias patógenas que generalmente causan epidemias esporádicas, geográfica o esta-

cionalmente localizadas, N. gonorrhoeae afecta a la vez a una gran cantidad de personas en todo el mundo. Como dato orientativo, en 1.985 se declararon en los Estados Unidos un millón de casos nuevos (388 casos por 100.000 habitantes), no obstante, se estima que la incidencia real debió oscilar entre 2 y 4 millones ya que sólo fue declarado un 25-50% del total (2). Si a lo anteriormente expuesto se añade el que una persona pueda padecer la infección en más de una ocasión, debido a la escasa o nula inmunidad que confiere el microorganismo en los cuadros localizados, se pueden comprender los graves trastornos tanto sociales como económicos que conlleva esta enfermedad.

En España, desde que se incluyó la infección gonocócica dentro de las enfermedades de declaración obligatoria, el número de casos ha ido incrementándose paulatinamente, a excepción de lo ocurrido en 1.986 en el que la incidencia: 77'83 por 100.000 habitantes (30.937 casos), fue ligeramente inferior a la del año anterior, que fue 79'83 por 100.000 (3).

A esta alta incidencia hay que unir el gran problema que presenta N. gonorrhoeae en el campo terapéutico, debido a la resistencia desarrollada por el microorganismo a los agentes antimicrobianos. Al impacto que produjo en 1.976 la aparición de cepas productoras de penicilinas mediada por plásmidos, se ha sumado la detección de cepas que presentan resistencia simultánea a varios agentes antimicrobianos y que viene determinada cromosómicamente (4).

De todo lo anterior se deduce la imperiosa necesidad de llevar a cabo un control de la infección. En este sentido, y ya desde los años 40, se ha venido realizando un continuo esfuerzo para caracterizar las cepas de N. gonorrhoeae, lo que supondría un primer paso para dicho con

trol tal como ha sucedido en otras enfermedades infecciosas.

✓ Es de todos conocido que microorganismos pertenecientes a una misma especie pueden poseer diferente poder patógeno y de virulencia, así como presentar distintos patrones de sensibilidad; conociendo las características del microorganismo se podrían explicar problemas planteados en cuanto a infectividad, transmisión, evolución de la bacteria y, sobre todo, evaluar las medidas de control llevadas a cabo en relación a la infección.

La primera aproximación al problema ha sido el intento de ✓ correlacionar la sensibilidad del microorganismo con la localización de la infección, relación que ha sido demostrada en numerosos trabajos en los que se han asociado cepas muy sensibles a Penicilina con la infección gono-cócica diseminada (I.G.D.) (5).

Durante los años 70 y dada la inexistencia de un método adecuado que distinguiera cepas de N. gonorrhoeae entre sí con fines epidemiológicos, hizo que los esfuerzos se centraran en la realización de un sistema de diferenciación, basado en los requerimientos nutricionales del microorganismo o auxotipia; dicho método subdivide por lo tanto a la población bacteriana, de acuerdo a su capacidad de crecer en un medio de agar químicamente definido, que contiene o carece de ciertos componentes (6).

Más tarde, en la década de los 80, la clasificación epidemiológica de N. gonorrhoeae se ha fundamentado en la antigenicidad del microorganismo, desarrollándose sistemas de ✓ serotipación del mismo. La estructura antigénica que se ha aprovechado para tal motivo ha sido el antígeno " W ", localizado en la proteína principal (proteína I) de la membrana externa de N. gonorrhoeae (7).

Dos equipos de investigación, uno de E.E.U.U. y otro de Suecia, trabajando independientemente, han obtenido dos sistemas de anticuerpos monoclonales diferentes, denominados GS y Ph respectivamente, dirigidos a los diferentes epitopos (forma más simple del determinante antigénico presente sobre una molécula compleja del antígeno) del antígeno " W " y usando la técnica de coaglutinación, han logrado diferenciar cepas de N. gonorrhoeae. Los dos sistemas aunque distintos, presentan una buena correlación entre sí y poseen el mismo poder resolutivo; no obstante, este poder aumenta si se emplean ambos sistemas para diferenciar las cepas (8).

Tanto con la auxotipia como con la serotipia, se han encontrado asociación entre determinados grupos de gonococos y:

a) Diferentes síndromes: las cepas que necesitan Arginina, Hipoxantina y Uracilo (AHU⁻) y aquellas pertenecientes al serogrupo WI, se han relacionado con la producción de cuadros de I.G.D. (9).

b) Sexo y preferencia sexual: las cepas aisladas de pacientes varones homosexuales, suelen ser no requirientes o prototróficas y pertenecen más frecuentemente al serogrupo WII (10, 11).

c) Distribuciones geográficas: las cepas pertenecientes al serogrupo WI se ha visto que predominan en ciudades pequeñas de Suecia (12).

Al mismo tiempo, mediante el estudio de estos caracteres fenotípicos, se han detectado cambios temporales en la población bacteriana de un lugar determinado (13).

Se han estudiado también otros parámetros, tales como la determinación de la proteasa IgA₁, el análisis de hidratos de carbono que porta N. gonorrhoeae en su superficie mediante el uso de lectinas, la determinación de las secuencias de su ADN con enzimas de restricción y, por último, los plásmidos que alberga el microorganismo.

Es en este último apartado donde N. gonorrhoeae adquiere una mayor relevancia. Desde que en 1.976 se detectaran por primera vez cepas de N. gonorrhoeae productoras de penicilinas mediada por plásmidos, el estudio del contenido plasmídico del microorganismo ha ido aportando la descripción de nuevos plásmidos, indicándonos la importante dinámica de la genética de este microorganismo, que refleja su constante adaptación al medio en que se desarrolla.

En N. gonorrhoeae existen cuatro tipos de plásmidos:

- 1.- Aquéllos que no tienen aún una función conocida, llamados plásmidos crípticos, a los que pertenecen los plásmidos de peso molecular de 2'6 y 7'8 Megadaltons (Mda.).
- 2.- Los que tienen una función conjugativa o plásmidos conjugativos, gracias a los cuales puede mediar la transferencia de plásmidos de resistencia. A este grupo pertenece el plásmido de 24'5 Mda.
- 3.- Los que determinan la resistencia a antibióticos o plásmidos R. A los originariamente descritos como responsables de la producción de penicilinas, y cuyos pesos moleculares son de 3'2 y 4'5 Mda., se han ido uniendo otros de 2'9, 3 y 4 Mda.
- 4.- Recientemente se ha detectado un plásmido de 25'2

Mda. que confiere resistencia a Tetraciclina y que resulta de la unión del plásmido conjugativo de 24'5 Mda. y el determinante Tet presente en Streptococcus (14).

En cuanto a los mecanismos conocidos por los que las bacterias pueden intercambiar su material genético, en N. gonorrhoeae se han descrito dos: la conjugación, cuyo significado en la ecología natural del microorganismo es desconocido, aunque, a través de diversos estudios epidemiológicos, se sugiere que es el modo principal de transmisión de plásmidos R, y la transformación que, hasta hace poco, parecía ser el único mecanismo de intercambio genético entre cepas de N. gonorrhoeae (15).

La transformación ha sido empleada fundamentalmente en el laboratorio para el conocimiento de resistencia a agentes antimicrobianos: con esta técnica, se pudo explicar el origen de los plásmidos R de N. gonorrhoeae, que se suponen procedentes de plásmidos equivalentes de Hae - mophilus ducreyi (16). Recientemente, se ha llegado a transformar Neisseria cinerea con plásmidos R de N. gonorrhoeae (17).

Siguiendo esta serie de hechos, se podría sugerir la posibilidad de que en algún momento, N. gonorrhoeae pudiera ser fuente de plásmidos R para otras bacterias de vital interés para el hombre.

Basándonos en todos estos datos recogidos hasta ahora, hemos tratado de conocer la epidemiología de las cepas de N. gonorrhoeae aisladas en nuestro medio, para ello, hemos caracterizado 116 cepas obtenidas en el periodo de un año (Julio de 1.985 a Julio de 1.986) de 107 pacientes que acudieron al Centro de Diagnóstico de Enfermedades de Transmisión Sexual de la Facultad de Medicina de Sevi-

lla, a través del cual, tuvimos acceso a la documentación clínica de los pacientes. A la vez nos propusimos el análisis genético de los posibles plásmidos diferentes, en cuanto a peso molecular, a los descritos hasta ahora en la literatura, que pudieran detectarse a lo largo del trabajo.

Para todo esto se realizaron los siguientes estudios:

a) En primer lugar se analizó la sensibilidad de las cepas de N. gonorrhoeae a diferentes agentes antimicrobianos mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (C.M.I.).

b) Posteriormente se estudió el contenido plasmídico de las cepas de N. gonorrhoeae mediante electroforesis en gel de agarosa, para calcular después, de forma aproximada, el peso molecular de los plásmidos.

c) Se determinaron las características fenotípicas en cuanto a requerimientos nutricionales o auxotipia de las cepas de N. gonorrhoeae, observando su crecimiento en diversos medios de cultivo.

d) Se estableció el serogrupo y el serotipo de las cepas en estudio valiéndonos de la técnica de coagulación, con anticuerpos monoclonales dirigidos frente a la proteína principal de la membrana externa de N. gonorrhoeae, empleando los dos sistemas de anticuerpos monoclonales (GS y Ph) mencionados anteriormente. ✓

e) Se aislaron y purificaron los plásmidos que se creyeron diferentes en cuanto a peso molecular a los descritos, para analizar posteriormente su composición y funciones y, con estos datos, tener criterios de juicio para

considerarlos o no como elementos de ADN extracromosómicos distintos a los ya publicados en la literatura. Para lo cual:

1.- Se estudió su patrón de corte con enzimas de restricción.

2.- Se transformó con cada uno de ellos por separado, la cepa de Escherichia coli (E. coli) K12 C600, libre de contenido plasmídico y cuyas características fenotípicas son conocidas.

3.- Se realizó la técnica de hibridación de los ADNs de plásmidos problemas con ADNs de plásmidos de N. gonorrhoeae y E. coli cuyos pesos moleculares, patrones de restricción e información genética han sido ya descritos.

MATERIALES

1.- POBLACION BACTERIANA

1.1.- Se estudiaron 116 cepas de N. gonorrhoeae, aisladas en el Departamento de Microbiología del Hospital Universitario de Sevilla, procedentes de muestras clínicas de 107 pacientes atendidos durante el periodo de un año (Julio 1.985 - Julio 1.986) en el Centro de Diagnóstico de Enfermedades de Transmisión Sexual de la Facultad de Medicina de Sevilla.

Se usaron además las siguientes cepas:

1.2.- Staphylococcus epidermidis (S. epidermidis) ATCC

27626 y N. gonorrhoeae GC1-182 productoras de penicilinas, utilizadas como controles positivos en la determinación de la producción de penicilinas y, como controles negativos, las cepas de N. gonorrhoeae WHO III y E. coli ATCC 25922.

1.3.- E. coli J53 V517 resistente a Cefalotina, Kanamicina y Amikacina cedida por F. Macrina (18), usada como cepa patrón para la medición de los pesos moleculares de los plásmidos por albergar ocho de pesos moleculares variados y conocidos: 35'8, 4'8, 3'6, 3'4, 2'6, 2, 1'8 y 1'3 Mda. respectivamente.

1.4.- N. gonorrhoeae WHO III, V y VII de A. Reyn (Statens Serum Institut Copenhagen, Denmark) cedidas por P. Piot, usadas como controles en la determinación de la C.M.I.

1.5.- N. gonorrhoeae ATCC 27628 auxotipo 1 (no requiriente), N. gonorrhoeae ATCC 27630 auxotipo 9 ($\text{Pro}^- \text{Hyx}^-$) y N. gonorrhoeae ATCC 27631 auxotipo 22 ($\text{Pro}^- \text{Met}^- \text{Thp}^-$) como controles en la realización de la auxotipia.

1.6.- N. gonorrhoeae U51, serotipo Afegk y N. gonorrhoeae 4412, serotipo Baej, para el control de la serotipia.

1.7.- E. coli K12 C600 usada como cepa receptora en la transformación con el ADN plasmídico (19).

1.8.- E. coli K12 C600 P39 y E. coli K12 C600 P700, portadoras de plásmidos determinantes de la producción de los enzimas dehidrofolato-reductasa tipos I y II, empleadas para la determinación del gen responsable de la resistencia a Trimetoprim.

2.- PRODUCTOS

2.1.- Químicos y biológicos

- * Acetato potásico (Sigma).
- * Acetato sódico (Sigma).
- * Acido acético glacial (Panreac).
- * Acido bórico (Sigma).
- * Acido Cis-oxalacético (Sigma).
- * Acido clorhídrico (Panreac).
- * Acido L-aspártico (Sigma).
- * Acido L-glutámico (Sigma).
- * ADN del fago Lambda (New England Biolabs).
- * Agarosa tipo I (Sigma).
- * Albúmina sérica bovina fracción V (Sigma).
- * Almidón soluble (Merck).
- * Anticuerpos monoclonales frente a los distintos antígenos de la proteína principal de la membrana externa de N. gonorrhoeae cedidos por S. Bygdeman (Huddinge University Hospital, Suecia).

1.- Sistema GS elaborado por Knapp y cols. en Seattle. Washington. Estados Unidos.

2.- Sistema Ph elaborado por Bygdeman y cols. en Huddinge. Suecia.

- * Azul de bromofenol (Sigma).
- * Bicarbonato sódico (Merck).
- * Biotina (Merck).
- * Bromuro de etidio (Sigma).
- * Cefalosporina cromogénica: Nitrocefina^R (Oxoid).
- * Citrato sódico (Sigma).
- * Cloroformo (Panreac).
- * Cloruro amónico (Sigma).
- * Cloruro cálcico dihidratado (Sigma).
- * Cloruro de cesio (Sigma).
- * Cloruro magnésico 6 veces hidratado (Sigma).

- * Cloruro potásico (Sigma).
- * Cloruro sódico (Sigma).
- * Cocarboxilasa o Pirofosfato de Tiamina Clorhídrica (Sigma).
- * Colina clorhídrica (Sigma).
- * Discos de azúcares impregnados de una solución de hidratos de carbono (glucosa, lactosa, maltosa y sacarosa) (Difco).
- * Discos de oxidasa (Difco) impregnados en una solución de para-aminodimetilanilina.
- * Ditiotreitól (Sigma).
- * EDTA Na₂ o Acido etilendiaminatetraacético disódico (Sigma).
- * Enzimas de restricción:
 - Bam HI (Bethesda Research Laboratories).
 - Hinc II (New England Biolabs).
 - Hind III (Bethesda Research Laboratories).
- * Espermina tetraclorhídrica (Sigma).
- * Etanol absoluto (Panreac).
- * Fenol (Panreac).
- * Ficoll 400 (Sigma).
- * Fosfato dipotásico (Merck).
- * Fosfato disódico (Merck).
- * Fosfato monopotásico (Merck).
- * Fosfato monosódico (Merck).
- * Glicerol (Difco).
- * Glucosa (Sigma).
- * Hemina (Sigma).
- * Hidróxido sódico (Merck).
- * Hipoxantina (Sigma).
- * Isobutanol (Merck).
- * Isopropanol (Merck).
- * Lauril sulfato sódico (SDS) (Sigma).
- * Lisozima clorhídrica (Sigma).
- * L-alanina (Sigma).
- * L-arginina clorhídrica (Sigma).

- * L-asparagina monohidratada (Sigma).
- * L-cisteína hidrociorhídrica (Sigma).
- * L-cistina (Sigma)
- * L-fenilalanina (Sigma).
- * L-glutamina (Sigma).
- * L-histidina (Sigma).
- * L-isoileucina (Sigma).
- * L-leucina (Sigma).
- * L-lisina clorhídrica (Sigma).
- * L-metionina (Sigma).
- * L-prolina (Sigma).
- * L-tirosina (Sigma).
- * L-treonina (Sigma).
- * L-triptófano (Sigma).
- * Mioinositol (Sigma).
- * NAD o Nicotinamida adenina dinucleótido (Sigma).
- * Nitrato férrico 9 veces hidratado (Sigma).
- * Nitritotrietanol 2 2'2'' (Merck).
- * Orgenic's Chemiprobe tm. (Organics Ltd.).
- * Pantotenato cálcico (Sigma).
- * Polietilenglicol (Sigma).
- * Polivinilpirrolidona (Sigma).
- * Púrpura de bromocresol (Sigma).
- * Ribonucleasa A tipo III (Sigma).
- * Sacarosa (Sigma).
- * Saponina (Merck).
- * Sulfato magnésico 7 veces hidratado (Sigma).
- * Sulfato de manganeso monohidratado (Sigma).
- * Sulfato potásico (Sigma).
- * Tiamina clorhídrica (Sigma).
- * Triton X-100 (Sigma).
- * Trizma base o tris-base (Sigma).
- * Uracilo (Sigma).

2.2.- Agentes antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos fueron utilizados en forma de polvo valorado y, cuando no se pudieron obtener así, se empleó la forma comercial. Las diluciones de los mismos oscilaron entre 0'00045 y 64 ug/ml, si bien en cada caso concreto del antimicrobiano, el rango se acotó según los datos hallados en la literatura. A continuación exponemos cuáles fueron y el rango de concentraciones, en ug/ml, que se estudiaron.

- 1.- Ciprofloxacina (Bay-09867) (Bayer): 0'00045-0'03.
- 2.- Ceftriaxona (Rocefin o RO-13-9904/01) (Roche): 0'00045-0'06.
- 3.- Tetraciclina (Bristol): 0'06-8.
- 4.- Eritromicina (Abbot): 0'0075-4.
- 5.- Espectinomicina: Kemp^R (Upjhön): 2-64.
- 6.- Ofloxacina (Hoechst): 0'0037-0'25.
- 7.- Penicilina: Penilevel^H 1.000.000 U (Level): 0'0018-32.

En la tabla I exponemos los agentes antimicrobianos utilizados en la determinación de la C.M.I., así como los solventes y diluyentes de los mismos.

Tabla I: Agentes antimicrobianos usados en la determinación de la C.M.I., solventes y diluyentes empleados en las soluciones de almacenamiento de los mismos.

Agente antimicrobiano	Solvente	Diluyente
Ciprofloxacina	Agua destilada	Agua destilada
Ceftriaxona	" "	" "
Tetraciclina	" "	" "
Eritromicina	Etanol al 20%	" "

Tabla I: (Continuación)

Agente antimicrobiano	Solvente	Diluyente
Espectinomicina	Alcohol benzílico	Agua destilada
Ofloxacina	Hidróxido sódico 0'1 N	" "
Penicilina	Agua destilada	" "

3.- TAMPONES Y SOLUCIONES

3.1.- Tampón de electroforesis: Tris-Borato-EDTA (TBE),
pH 8'2

- * Tris-base 8'9 mM.....10'8 g
- * EDTA Na₂ 2'5 mM.....0'93 g
- * Acido bórico 89 mM.....5'5 g
- * Agua destilada.....900 ml

Ajustar el pH una vez disueltos los componentes y completar con agua destilada hasta 1.000 ml.

3.2.- Solución de Tris-ClH (Tris) 1 M

- * Tris-base.....12'11 g
- * Agua destilada.....80 ml

Ajustar el pH deseado con ácido clorhídrico concentrado y completar con agua destilada hasta 100 ml. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 20 minutos.

3.3.- Solución de EDTA Na₂ 0'5 M, pH 8

- * EDTA Na₂.....18'61 g
- * Hidróxido sódico.....2 g
- * Agua destilada.....80 ml

Disolver el EDTA Na₂ en el agua destilada, en agitación y a 60° C. Añadir 2 g de Hidróxido sódico para ajustar el pH a 8 y completar hasta 100 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121° C 20 minutos.

3.4.- Tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE), pH 8

* Tris-base 0'04 M.....	4'84 g
* Acido acético glacial.....	1'14 ml
* EDTA Na ₂ 0'5 M, pH 8.....	2 ml
* Agua destilada.....	1.000 ml

3.5.- Solución de SDS al 3% en Tris 50 mM, pH 12'6

* Tris 1 M, pH 12'6.....	5 ml
* SDS.....	3 g
* Agua destilada.....	95 ml

3.6.- Solución indicadora A

* Púrpura de bromocresol.....	250 mg
* Glicerol.....	50 ml
* Tampón TAE, pH 8.....	50 ml

3.7.- Solución reveladora A

* Bromuro de etidio.....	0'5 mg
* Tampón TAE, pH 8.....	1000 ml

3.8.- Solución I de lisis alcalina

* Glucosa 50 mM.....	0'9 g
* EDTA Na ₂ 0'5 M, pH 8.....	2 ml
* Tris 1 M, pH 8.....	2'5 ml
* Agua destilada.....	95'5 ml

3.9.- Solución II de lisis alcalina

- * Hidróxido sódico.....0'8 g
- * SDS.....1 g
- * Agua destilada.....100 ml

3.10.- Acetato potásico 5 M

- * Acetato potásico.....49'25 g
- * Agua destilada.....80 ml

Disolver el Acetato potásico y completar con agua destilada hasta 100 ml. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 20 minutos.

3.11.- Solución III de lisis alcalina

- * Acetato potásico.....60 ml
- * Acido acético glacial.....11'5 ml
- * Agua destilada.....28'5 ml

3.12.- Solución de Fenol saturado con Tris 1 M, pH 7'5

- * Licuar el fenol cristalino calentando a 60° C
- * Añadir un volumen igual de fenol que de Tris 1 M, pH 7'5 y mezclar bien dejando que se separen las dos fases.
- * Desechar la fase superior y repetir estos dos últimos pasos hasta que el pH de la fase inferior sea igual a 7'5.
- * Transferir la fase inferior a otro recipiente.

3.13.- Solución de Fenol/Cloroformo 1/1 (v/v)

- * Fenol saturado con Tris 1 M, pH 7'5.....50 ml
- * Cloroformo.....50 ml

Mezclar bien y almacenar a 4° C protegido de la luz.

3.14.- Solución de Cloroformo/Alcohol isoamílico 24/1
(v/v)

- * Cloroformo.....96 ml
- * Alcohol isoamílico.....4 ml

3.15.- Tampón Tris-Edta (TE), pH 8

- * Tris 1 M, pH 8.....1 ml
- * EDTA Na₂ 0'5 M.....0'2 ml
- * Agua destilada.....98'8 ml

3.16.- Solución indicadora B

- * Azul de bromofenol.....125 mg
- * Sacarosa.....20 g
- * Agua destilada.....80 ml

Disolver los componentes y completar con agua destilada hasta 100 ml.

3.17.- Solución reveladora B

- * Bromuro de etidio.....0'5 mg
- * Tampón TBE, pH 8'2.....1000 ml

3.18.- Solución de Lisozima-Ribonucleasa

- * Ribonucleasa A tipo III 0'3 U/ml.....2'6 mg

La Ribonucleasa se ha de tratar previamente a 90° C durante 10 minutos con el fin de eliminar la posible ADN-asa contaminante.

- * Lisozima 7.500 U/ml.....36 mg
- * Azul de bromofenol.....50 mg
- * Sacarosa.....20 mg

* Tampón TBE, pH 8'2.....80 ml

Disolver los componentes y completar hasta 100 ml con tampón TBE, pH 8'2.

3.19.- Solución de SDS al 0'2% y Sacarosa al 10% en tampón TBE, pH 8'2

* SDS.....0'2 g
 * Sacarosa.....10 g
 * Tampón TBE, pH 8'2.....80 ml

Disolver los componentes y llevar hasta 100 ml con tampón TBE, pH 8'2.

3.20.- Solución de recubrimiento: SDS al 0'2% y Sacarosa al 5% en tampón TBE, pH 8'2

* SDS.....0'2 g
 * Sacarosa.....5 g
 * Tampón TBE, pH 8'2.....80 ml

Disolver los componentes y llevar hasta 100 ml con tampón TBE, pH 8'2.

3.21.- Solución de sales (TSS) para preparar el inóculo bacteriano en la determinación de la C.M.I. y de la auxotipia.

* Solución A.....35 ml

Cloruro sódico.....5'85 g
 Cloruro potásico.....0'186 g
 Cloruro amónico.....0'401 g
 Fosfato disódico.....0'170 g
 Citrato sódico.....0'647 g

Agua destilada.....350 ml

* Solución B.....5 ml

Sulfato magnésico.....0'616 g

Sulfato de manganeso 0'15 M.0'05 ml

Agua destilada.....50 ml

* Cloruro cálcico 0'25 M.....0'1 ml

Esterilizar las tres soluciones en autoclave a 121° C durante 20 minutos y mezclar las cantidades indicadas, suplementando finalmente con 0'8 ml de glicerol y 59 ml de agua destilada estéril. Ajustar el pH a 7'4 con Hidróxido sódico 1 N.

3.22.- Tampón fosfato salino (PBS) pH 7'5 para la preparación del inóculo en la determinación del serotipo

* Cloruro sódico.....8'5 g

* Fosfato monosódico.....3'22 g

* Fosfato disódico.....0'18 g

* Agua destilada.....1000 ml

Una vez disueltos los componentes, esterilizar en autoclave a 121° C durante 20 minutos.

3.23.- Tampón de Sacarosa en Tris 0'05 M. pH 8

* Sacarosa.....25 g

* Tris 1 M, pH 8.....5 ml

* Agua destilada.....80 ml

Disolver la Sacarosa, añadir el Tris y completar con agua destilada hasta 100 ml.

3.24.- Solución de Lisozima en Tris 0'25 M, pH 8

* Lisozima.....	500 mg
* Tris 1 M, pH 8.....	25 ml
* Agua destilada.....	75 ml

3.25.- Solución de EDTA Na₂ 0'2 M, pH 8

* EDTA Na ₂ 0'5 M. pH 8.....	40 ml
* Agua destilada.....	60 ml

3.26.- Solución de Triton X-100 al 2% en Tris 0'05 M, pH 8/EDTA Na₂ 0'05 M, pH 8

* Triton X-100.....	2 ml
* Tris 1 M, pH 8.....	5 ml
* EDTA Na ₂ 0'5 M, pH 8.....	10 ml
* Agua destilada.....	83 ml

3.27.- Solución de Cloruro sódico 5 M

* Cloruro sódico.....	29'2 g
* Agua destilada.....	100 ml

3.28.- Solución de Cloruro de cesio

* Cloruro de cesio.....	100 g
* Tampón TE, pH 8.....	100 ml

3.29.- Solución de Bicarbonato sódico al 2% en EDTA Na₂ 1 mM

* Bicarbonato sódico.....	2 g
* EDTA Na ₂ 0'5 M.....	0'2 ml
* Agua destilada.....	99'8 ml

3.30.- Solución de Acetato sódico 4 M

- * Acetato sódico.....54'4 g
- * Agua destilada.....80 ml

Disolver el Acetato sódico y completar con agua destilada hasta 100 ml. Esterilizar por filtración, usando filtros Sterefix^R de 0'2 um de diámetro.

3.31.- Tampón de digestión (10 X) para las enzimas de restricción: Bam HI, Hinc II y Hind III

- * Cloruro sódico 1 M.....5 ml
- * Tris 1 M, pH 7'5.....1 ml
- * Cloruro magnésico 1 M.....1 ml
- * Ditiotreitól 1 M.....0'1 ml
- * Agua destilada estéril.....2'9 ml

3.32.- Solución de EDTA Na₂ 0'5 M, pH 7'5

- * EDTA Na₂.....18'61 g
- * Hidróxido sódico.....1 g
- * Agua destilada.....80 ml

Disolver el EDTA Na₂ en el agua, calentando a 60° C en agitación. Añadir 1 g de Hidróxido sódico para ajustar el pH a 7'5 y esterilizar en autoclave a 121° C durante 20 minutos.

3.33.- Solución indicadora C

- * Azul de bromofenol.....250 mg
- * Sacarosa.....40 g
- * Agua destilada.....80 ml

Disolver los componentes en los 80 ml de agua des -

tilada y completar con la misma hasta 100 ml.

3.34.- Solución de Sulfato magnésico 1 mM

- * Sulfato magnésico.....0'246 g
- * Agua destilada.....1000 ml

3.35.- Solución de Cloruro cálcico 50 mM/Tris 10 mM, pH 8

- * Cloruro cálcico 0'25 M.....20 ml
- * Tris 1 M, pH 8.....1 ml
- * Agua destilada.....79 ml

3.36.- Tampón Cloruro citrato sódico (SSC), pH 7 (20 X)

- * Citrato sódico.....8'82 g
- * Cloruro sódico.....17'53 g
- * Agua destilada.....80 ml

Disolver las sales en 80 ml de agua destilada, ajustar el pH con Hidróxido sódico 10 N y completar hasta 100 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 20 minutos.

3.37.- Solución de Denhardt (50 X)

- * Ficoll 400.....1 g
- * Polivinilpirrolidona.....1 g
- * Albúmina sérica bovina fracción V.....1 g
- * Agua destilada hasta.....100 ml

Disolver los componentes y esterilizar por filtración. Repartir en alícuotas de 5 ml y conservar a - 20° C.

3.38.- Solución de SSC (2 X)/SDS 0'5%

- * SSC (20 X).....10 ml
- * SDS.....0'5 g
- * Agua destilada.....90 ml

3.39.- Solución de SSC (2 X)/SDS 0'1%

- * SSC (20 X).....10 ml
- * SDS.....0'1 g
- * Agua destilada.....90 ml

3.40.- Solución de SSC (0'1 X)/SDS 0'1%

- * SSC (20 X).....0'5 ml
- * SDS.....0'1 g
- * Agua destilada.....99'5 ml

3.41.- Solución de lavado nº 1 de hibridación

- * Tris 1 M, pH 7'5.....10 ml
- * Cloruro magnésico 1 M.....0'2 ml
- * Cloruro sódico 5 M.....20 ml
- * Triton X-100 al 1%.....5 ml
- * Agua destilada.....64'8 ml

3.42.- Solución de lavado nº 2 de hibridación

- * Tris 1 M, pH 9'5.....10 ml
- * Cloruro magnésico 1 M.....5 ml
- * Cloruro sódico 5 M.....0'02 ml
- * Agua destilada.....84'98 ml

3.43.- Solución de sustrato cromogénico de hibridación,
para 100 cm² de membrana de nitrocelulosa

- * Nitroazul de tetrazolio.....1'5 mg
- * 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato.....1 mg

- * Tris 1 M, pH 9'5.....0'5 ml
- * Cloruro sódico 5 M.....0'05 ml
- * Cloruro magnésico.....0'025 ml
- * Agua destilada.....4'375 ml

3.44.- Solución de Cloruro sódico 1'5 M/Hidróxido sódico
0'5 M

- * Cloruro sódico 5 M.....30 ml
- * Hidróxido sódico.....2 g
- * Agua destilada.....70 ml

3.45.- Solución de Cloruro sódico 1'5 M/Tris 1 M, pH 8

- * Cloruro sódico 5 M.....30 ml
- * Tris 2 M, pH 8.....50 ml
- * Agua destilada.....20 ml

4.- MEDIOS DE CULTIVO Y CONSERVACION

4.1.- Medio usado como base de crecimiento de N. gonorhoeae: Thayer-Martin modificado (GC) (20)

- * Sol A) Bacto GC medium (Difco).....36 g
Agua destilada.....500 ml
- * Sol B) Bacto Hemoglobin (Difco).....10 g
Agua destilada.....500 ml

Disolver la Sol A) calentando hasta la ebullición y la Sol B) en frío, ambos en agitación. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 20 minutos y dejar enfriar hasta alcanzar 50-55° C. Añadir a la Sol A) 10 ml de Antimicrobiotic CNV (Colistina 7.500 ug, Nistatina 12.500 ug y Vancomicina 3.000 ug) (Difco) y a la solución B) 10 ml

de Bacto Suplemento B (Difco). Mezclar A) y B) hasta su homogeneización y repartir en placas de Petri estériles de 10 cm de diámetro.

4.2.- Medio empleado como base de crecimiento de N. gonorrhoeae para el aislamiento de sus plásmidos: medio de Shapiro (21)

* Proteasa peptona nº 3 (Difco).....	15	g
* Fosfato dipotásico.....	4	g
* Fosfato monopotásico.....	1	g
* Cloruro sódico.....	5	g
* Almidón soluble.....	1	g
* Bicarbonato sódico.....	420	mg
* Agua destilada.....	1000	ml

Disolver en agitación y esterilizar en autoclave a 121° C durante 20 minutos. Suplementar con 1% de Isovitalex (BBL) cuando alcance 50-55° C.

4.3.- Medio usado como base de crecimiento para el aislamiento de plásmidos de E. coli: Caldo Tripticasa Soja (TSB)

* TSB (Difco).....	30	g
* Agua destilada.....	1000	ml

Esterilizar en autoclave a 121° C durante 20 minutos.

4.4.- Medio utilizado como base de crecimiento para la determinación de la auxotipia: medio definido para Neisserias (NEDA) completo (22)

Solución ml/l

* Sol.1: Acid.L-glutámico, Acid.L-aspár-

Solución	ml/l
tico, EDTA Na ₂ , Cloruro sódico, Cloruro de magnesio, Sulfato po- tásico, Cloruro amónico.....	100
* Sol.2a:L-arginina clorhídrica, Glici- na, L-serina.....	10
* Sol.2b:L-leucina, L-isoleucina, L-vali- na.....	10
* Sol.3: Lactato sódico, Glicerol, Al- cohol polivinílico, Tween 80.....,	5
* Sol.4a:Uracilo 17'8 mM.....	4
* Sol.4b:Hipoxantina 5'88 mM.....	4
* Sol.5: Fosfato dipotásico, Fosfato mo- nopotásico.....	200
* Sol. de L-tirosina 0'05 M.....	6
* Sol. de L-cisteína hidrociorhídrica 0'1 M...3'5	3'5
* Sol. de L-cistina 0'05 M.....	3
* Sol. de Hidróxido sódico 5 N hasta llevar el pH a 7'1	
* Sol. 8: L-triptófano, L-treonina, L-a- lanina, L-lisina clorhídrica, L-prolina.....	10
* Sol.9: L-fenilalanina, L-asparagina mo- nohidrato.....	5

Solución	ml/1
* Sol. de L-glutamina 0'068 M.....	5
* Sol. de L-histidina 0'05 M.....	2
* Sol. de L-metionina 0'1 M.....	1
* Sol. de Espermina tetraclorhídrica 0'05 M....	5
* Sol. de Bicarbonato sódico 0'1 M.....	0'5
* Sol. de Glucosa al 20%.....	25
* Sol. de Acetato sódico 2'5 M.....	10
* Sol.6: Hemina, L-histidina, Nitrilo- trietanol 2 2'2'.....	2
* Sol.7: Nicotinamida adenina dinucleó- tido, Tiamina clorhídrica, Pan- totenato cálcico.....	0'2
* Sol.10: Colina clorhídrica, Mioinositol.....	0'2
* Sol. de Biotina.....	1
* Sol. de Cocarboxilasa 0'01 M.....	0'1
* Sol. de Hidróxido sódico 1 N hasta lle- var el pH a 7'4	
* Agar nº 1 (Oxoid) al 2%.....	500
* Sol. de Cloruro cálcico 0'25 M.....	1
* Sol. de Nitrato férrico 0'01 M.....	1

Preparar previamente la mayoría de las soluciones indicadas y almacenarlas a 4° C salvo las excepciones que se irán señalando. Para la obtención de las soluciones, usar contenedores de vidrio, lavados escrupulosamente y a clarados con agua destilada. La esterilización se ha de hacer en autoclave a 121° C durante 20 minutos para las soluciones 1, 3, 5, 6, Cloruro cálcico y el agar y por filtración usando filtros Sterefix^R de 0'2 um para las siguientes: 2a, 2b, 4a, 4b, 7, 8, 9, 10, L-tirosina, L-cisteína hidrociorhídrica, Acido cis-oxalacético, L-glutamina, L-histidina, L-metionina, Espermina tetraclorhídrica, Bicarbonato sódico, Glucosa 20%, Acetato sódico, Cocarboxilasa y Nitrato férrico.

La preparación de las soluciones se hizo de la siguiente forma:

Solución 1

* Acido L-glutámico.....	13 g
* Acido L-aspártico.....	5 g
* EDTA Na ₂	37 mg
* Agua destilada.....	900 ml

Disolver estos componentes calentando a 50° C con la adición de 25 ml de Hidróxido sódico 5 N, repartiéndolos en alícuotas que se incorporan cada 20 minutos y agitando hasta obtener un pH de 7'2. Después añadir:

* Cloruro sódico.....	58 g
* Sulfato potásico.....	10 g
* Cloruro magnésico.....	4'1 g
* Cloruro amónico.....	2'2 g

Añadir agua destilada hasta obtener un volumen final de 1000 ml.

Solución 2a

* L-arginina clorhídrica.....	3	g
* Glicina.....	500	mg
* L-serina.....	1	g
* Agua destilada.....	200	ml

Solución 2b

* L-leucina.....	1'8	g
* L-isoleucina.....	600	mg
* L-valina.....	1'2	g
* Agua destilada.....	200	ml

Solución 3

* Lactato sódico.....	10	g
* Agua destilada.....	150	ml
* Glicerol.....	36'8	g
* Alcohol polivinílico.....	200	mg

Disolver calentando a 100° C durante 15-30 minutos en agitación. Dejar enfriar y añadir Hidróxido sódico hasta llevarlo a un pH 7'3 y añadir agua destilada hasta conseguir 195 ml. Después de esterilizar en autoclave a 121° C durante 20 minutos, añadir 5 ml de una solución de Tween 80 al 20% (v/v), previamente esterilizada también en autoclave, en las mismas condiciones anteriores.

Solución 4a

* Uracilo.....	200	mg
* Hidróxido sódico 5 N.....	2	ml

Disolver y adicionar 98 ml de agua destilada.

Solución 4b

- * Hipoxantina.....80 mg
- * Acido clorhídrico 1 N.....10 ml

Disolver y añadir 90 ml de agua destilada.

Solución 5

- * Fosfato dipotásico.....34'8 g
- * Fosfato monopotásico.....27'2 g
- * Agua destilada hasta.....2000 ml

Preparar las cuatro soluciones siguientes, el mismo día de la preparación del medio.

Solución de L-tirosina 0'05 M

- * L-tirosina.....181'2 mg
- * Acido clorhídrico 1 N.....4 ml

Disolver y adicionar 15 ml de agua destilada.

Solución de L-cisteína hidrociorhídrica 0'1 M

- * L-cisteína hidrociorhídrica.....350'3 mg
- * Acido clorhídrico 1 N.....5 ml

Disolver y adicionar 15 ml de agua destilada.

Solución de L-cistina 0'05 M

- * L-cistina.....240'3 mg
- * Acido clorhídrico 1 N.....5 ml

Disolver y adicionar 15 ml de agua destilada.

Solución de Acido cis-oxalacético

- * Acido cis-oxalacético.....200 mg
- * Agua destilada.....100 ml

Solución de Hidróxido sódico 5 N

- * Hidróxido sódico.....20 g
- * Agua destilada hasta.....100 ml

Solución 8

- * L-triptófano.....1'6 g
- * Agua destilada.....200 ml

Disolver, calentando a 50° C y añadir:

- * L-treonina.....1 g
- * L-alanina.....2 g
- * L-lisina clorhídrica.....1 g
- * L-prolina.....1 g

Solución 9

- * L-fenilalanina.....1 g
- * L-asparagina monohidrato.....1 g
- * Agua destilada.....200 ml

Disolver calentando a 50° C.

Solución de L-glutamina

- * L-glutamina.....1 g
- * Agua destilada.....100 ml

Solución de L-histidina

- * L-histidina.....776 mg
- * Agua destilada.....100 ml

Solución de L-metionina

- * L-metionina.....1'49 g
- * Agua destilada.....100 ml

Solución de Espermina tetraclorhídrica

- * Espermina tetraclorhídrica.....1'74 g
- * Agua destilada.....100 ml

Solución de Bicarbonato sódico

- * Bicarbonato sódico.....8'4 g
- * Agua destilada.....100 ml

Solución de Glucosa al 20%

- * Glucosa.....20 g
- * Agua destilada.....100 ml

Solución de Acetato sódico

- * Acetato sódico.....34 g
- * Agua destilada100 ml

Solución 6

- * Hemina.....100 mg
- * Nitrilotrietanol 2 2'2''.....4 ml

Disolver y añadir 96 ml de agua destilada y adicionar:

* L-histidina.....100 mg

Almacenar en alícuotas de 2 ml a -20° C

Solución 7

* NAD.....500 mg

* Tiamina clorhídrica.....250 mg

* Pantotenato cálcico.....500 mg

* Agua destilada.....50 ml

Almacenar en alícuotas de 1 ml a -20° C.

Solución 10

* Colina clorhídrica.....349 mg

* Mioinositol.....90 mg

* Agua destilada.....50 ml

Solución de Biotina

* Biotina.....5 ml

* Etanol acidificado con ácido clorhídrico
a pH 3-5.....5 ml

Solución de Cocarboxilasa

* Cocarboxilasa.....115 mg

* Agua destilada.....25 ml

Almacenar en alícuotas de 1 ml a -20° C.

Solución de Cloruro cálcico

* Cloruro cálcico.....3'68 g

* Agua destilada.....100 ml

Solución de Nitrato férrico 0'01 M

- * Nitrato férrico.....101 mg
- * Agua destilada.....25 ml

4.5.- Medio empleado como base de crecimiento para la determinación de la serotipia: medio de Kelloggs (23);

- * Bacto GC medium.....30 g
- * Agua destilada.....980 ml

Disolver calentando hasta su ebullición y esterilizar en autoclave a 121° C durante 20 minutos. Cuando alcance 48° C añadir:

- * Suplemento I.....10 ml

Glucosa.....1 g
 L-glutamina.....1 g
 Cocarboxilasa.....2 mg
 Agua destilada.....100 ml

- * Suplemento II.....10 ml

Nitrato férrico.....50 mg
 Agua destilada.....100 ml

Previamente esterilizados con filtros Sterefix^R de 0'2 um. Mezclar todos los componentes y repartir en placas de Petri estériles.

4.6.- Medio para el diagnóstico bioquímico de N. gonorrhoeae: medio base de Agar Tripticasa Cisteína (CTA) pH 7'3, usado para la determinación de la fermentación de azúcares por las cepas de N. gonorrhoeae

- * CTA (Difco).....29'5 g
- * Agua destilada.....1000 ml

Disolver calentando hasta la ebullición, ajustar el pH y repartir en tubos (6 ml/tubo).

4.7.- Medio para la determinación de la sensibilidad de N. gonorrhoeae a agentes antimicrobianos: Agar Diagnostic Sensitivity Test (DST agar) suplementado con 1% de Saponina y 5% de sangre estéril de caballo

- * DST agar (Oxoid).....40 g
- * Saponina.....10 g
- * Agua destilada.....1000 ml

Disolver calentando hasta la ebullición y esterilizar en autoclave a 121° C durante 20 minutos, dejar en --friar hasta alcanzar 50-55° C y añadir 50 ml de sangre es--téril de caballo (Materiales y Reactivos S.A.) y repar--tir en placas Petri a razón de 19 mls.

4.8.- Medio para la determinación de la sensibilidad de E. coli a agentes antimicrobianos: Mueller-Hinton

- * Mueller-Hinton (Difco).....38 g
- * Agua destilada.....1000 ml

Disolver calentando hasta su ebullición y esterilizar a 121° C durante 20 minutos; dejar enfriar hasta 50-55° C y repartir como anteriormente.

4.9.- Medio para la conservación y almacenamiento de ce--pas de N. gonorrhoeae: TSB suplementado con 15% de glicerol

- * TSB.....30 g
- * Glicerol.....150 ml
- * Agua destilada.....850 ml

Disolver en agitación y repartir en viales de 2 ml.
La esterilización se lleva a cabo en autoclave a 121° C
durante 20 minutos.

METODOS

1.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACION

1.1.- AISLAMIENTO

1.1.1.- Toma de muestras: las muestras fueron tomadas de uretra en el caso de pacientes varones y de endocérvix en mujeres; cuando el paciente era varón homosexual o una mujer prostituta, se tomó además una muestra de recto y o - tra de faringe. Todas ellas se obtuvieron con torunda de alginato cálcico que se cultivaron inmediatamente en placas conteniendo medio de Thayer-Martin modificado, de preparación reciente y preincubadas a 37° C en atmósfera con

8% de CO₂ y 70% de humedad y se mantuvieron en las mismas condiciones durante 24-48 horas.

1.1.2.- Diagnóstico presuntivo: se realizó una extensión aplicando directamente la torunda sobre un portaobjetos. Una vez fijada, por calor, se practicó una tinción de Gram. La visualización de diplococos gram negativos intracelulares se interpretó como posible infección gonocócica.

1.2.- IDENTIFICACION: Tras la incubación en medio de Thayer-Martin, las colonias sospechosas de ser N.gonorrhoeae, fueron identificadas mediante las siguientes pruebas:

1.2.1.- Morfología microscópica: visualización al microscopio óptico (1.000 aumentos) de diplococos gram negativos en una extensión y con tinción de Gram.

1.2.2.- Reacción de la oxidasa, un vez obtenido el crecimiento de las colonias en la placa y su identificación presuntiva con la tinción de Gram: se hizo contactar un disco de oxidasa, ligeramente humedecido con agua estéril, con una o dos colonias. Se consideró la prueba positiva al virar la coloración del disco de gris a violeta, debido a la producción de indofenol-oxidasa por parte de N.gonorrhoeae que, al actuar sobre la para-aminodimetilanilina existente en el disco, hace cambiar el color del mismo.

1.2.3.- Fermentación de azúcares: se utilizó el medio base CTA y discos comercializados de glucosa, lactosa, maltosa y sacarosa.

Para la realización de esta prueba, se depositó el disco sobre una o dos colonias del microorganismo en estudio y posteriormente se introdujo en el tubo que contenía el medio base CTA pH 7'3 (en el tercio superior del me -

dio). Se incubó a 37° C durante 24-48 horas; si el microorganismo fermenta el azúcar, al producir ácido, descenderá el pH del medio, lo que inducirá un cambio de color del rojo fenol que actúa como indicador de pH; el viraje de rojo a amarillo que indica la acidificación del medio se produce cuando el pH alcanza un valor menor o igual a 6'8.

En la tabla II podemos apreciar el tipo de azúcar fermentado por las diversas especies de Neisseria.

Tabla II: Identificación de las distintas especies de Neisseria según la utilización de azúcares.

Microorganismo	Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Lactosa
<u>N. gonorrhoeae</u>	+	-	-	-
<u>N. meningitidis</u>	+	+	-	-
<u>N. sicca</u>	+	+	+	-
<u>N. mucosa</u>	+	+	+	-
<u>N. subflava</u>	+	+	-	-
<u>N. flavescens</u>	-	-	-	-
<u>N. lactamica</u>	+	+	-	+

(lenta)

1.2.4.- Conservación de las cepas: a partir de un cultivo puro de N. gonorrhoeae, se tomó masa bacteriana en gran cantidad y se inoculó en un vial de congelación conteniendo 1'5 ml de TSB suplementado con un 15% de glicerol, se agitó hasta su homogeneización y se congeló a -70° C.

2.- DETERMINACION DE LA PRODUCCION DE PENICILINASA

Se siguió el método descrito por O'Callaghan y cols.

(24) usando Cefalosporina cromogénica (Nitrocefin^R) para la detección de cepas productoras de penicilinasas. Este compuesto presenta un color amarillo pajizo cuando el anillo B-lactámico se encuentra intacto, es decir oxidado, y color rojo cobrizo al reducirse mediante la acción del enzima (Figura 1) (o por acción de la luz).

La solución de Nitrocefin se compone de 1 mg del producto, disuelto en 1'9 ml de tampón fosfato 0'1 M, pH 7 y 0'1 ml de dimetilsulfóxido.

Se tomaron 2-5 colonias de la cepa de N. gonorrhoeae que había crecido en medio de Thayer-Martin modificado durante 24-48 horas y se emulsionaron en aproximadamente, 1 ml de agua destilada estéril. Posteriormente se añadieron unas gotas de solución cromogénica, se agitó bien la mezcla y se incubó 15 minutos en oscuridad, ya que como hemos dicho, la luz actúa sobre la Cefalosporina cromogénica produciendo la destrucción del anillo B-lactámico, es decir, tiene el mismo efecto que la penicilinasas.

Se consideraron cepas productoras de penicilinasas aquéllas que produjeron un cambio de coloración de la solución, de amarillo a rojo.

Como controles positivos se utilizaron una cepa de S. epidermidis ATCC 27626 y otra de N. gonorrhoeae GC1-189 que son productoras de penicilinasas y como controles negativos, una cepa de E. coli ATCC 25922 y una cepa de N. gonorrhoeae WHO III.

3.- DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A AGENTES ANTIMICROBIANOS

La determinación de la C.M.I. de los agentes antimicrobianos estudiados se realizó mediante el método de di-

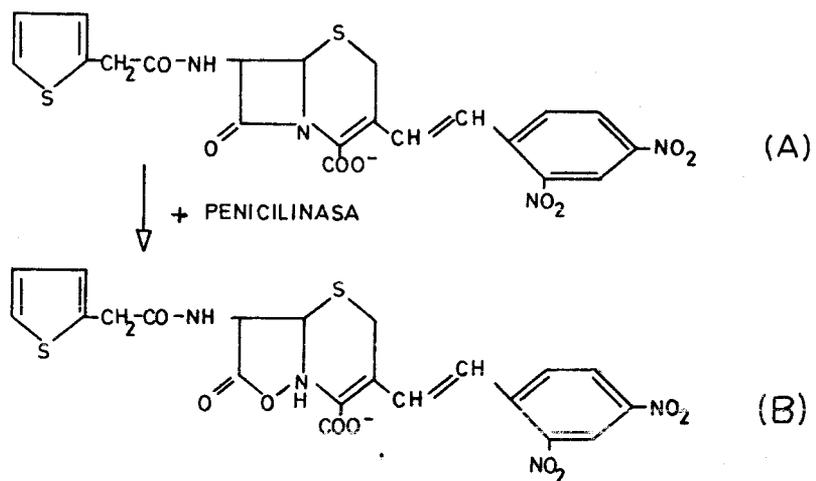


Figura 1.- Estructura química de la Cefalosporina cromogénica en estado oxidado (A) y reducido (B).

lución en agar (25). Definimos la C.M.I. como la concentración más baja del antimicrobiano que no permite el crecimiento aparente, tras 18 horas de incubación a 35° C, con un inóculo inicial aproximado de 10^5 bacterias/ml, expresada en ug/ml.

La CMI_{50} de un antimicrobiano es la menor concentración del mismo capaz de inhibir al 50% de las cepas bacterianas estudiadas y la CMI_{90} la menor concentración del antimicrobiano que inhibe al 90% de las mismas.

Para la inoculación de las cepas en la C.M.I. se usó un aparato replicador descrito por Steers y cols (26), con el que se pueden inocular, al mismo tiempo, 36 cepas bacterianas en la superficie de una placa de medio de cultivo.

El sistema consta de una cabeza de aluminio con 36 agujas, éstas se introducen en una base con igual número de pocillos, en cada uno de los cuales se encuentra una suspensión de los diferentes microorganismos a estudiar. Al extraerlas, cada aguja llevará 0'001 ml de la suspensión que será posteriormente depositada sobre la superficie de las placas.

3.1.- Preparación de las placas: partiendo de las soluciones madres de los agentes antimicrobianos: Ceftriaxona (1.142 ug/ml), Ciprofloxacina (6.870 ug/ml), Tetraciclina (1.600 ug/ml), Espectinomicina (625.000 ug/ml), Eritromicina (2.000 ug/ml), Ofloxacina (5.000 ug/ml) y Penicilina (150.000 ug/ml), se hicieron diluciones seriadas en base dos, de cada una de las cuales se tomó 1 ml que se depositó en una placa a la que se añadieron 19 ml de medio DST agar suplementado, mezclando hasta la completa homogeneización. La preparación de las placas se efectuó inmediatamente antes de su utilización para evitar

la inactivación del antimicrobiano.

3.2.- Preparación del inóculo: se partió de cultivos puros de N. gonorrhoeae en placas de GC, tomando de cada una, masa suficiente para que, al inocular en tubo conteniendo TSS, alcanzase una turbidez igual al número 1 en la escala estandar de Mc. Farland, medida en un nefelómetro modelo Spectronic 20 (Baush & Lomb), lo que equivale aproximadamente a 3×10^8 bacterias viables o ufc/ml; de esta suspensión se tomó 0'5 ml y se diluyó en 4'5 ml de la misma solución obteniendo 3×10^7 ufc/ml.

Del mismo modo se procedió a la obtención de inóculo de las cepas controles: N. gonorrhoeae WHO III, V y VII.

Se realizó un control del inóculo; para ello, y partiendo de una turbidez del número 1 de la escala de Mc. Farland, se hicieron diluciones seriadas en base diez y se extendió 0'1 ml de cada dilución en placas de DST agar, incubando 24-48 horas, tras lo cual se procedió al recuento de las colonias que aparecieron en la placa. El número de colonias multiplicado por el factor de dilución correspondiente, nos permitió calcular con exactitud el inóculo original.

3.3.- Placas controles: para demostrar el crecimiento de todas las cepas, o poner de manifiesto su posible contaminación, se empleó en cada serie de antimicrobiano en estudio dos placas libres del mismo, replicándolas antes y después de cada serie de antimicrobiano.

3.4.- Procedimiento de replicación: una vez rellenos los pocillos se inocularon las placas con el replicador de Steers empezando, siempre y en cada serie, por las placas que contenían la menor concentración del antimicrobiano,

continuando en orden creciente, para evitar el posible arrastre del antimicrobiano de una placa de mayor concentración a otra de menor, con lo cual se falsearían los resultados.

Se dejaron secar las placas a temperatura ambiente, incubándolas posteriormente a 37° C en atmósfera al 8% de CO₂ y 70% de humedad durante 24-48 horas, al término de las cuales se realizó la lectura.

4.- DETECCION DE PLASMIDOS Y CALCULO DE SUS PESOS MOLECULARES

Se emplearon tres métodos de lisis bacteriana y purificación del ADN plasmídico, con la finalidad de elegir el más adecuado; el producto obtenido en cada caso se sometió a una electroforesis en gel de agarosa, debido a la propiedad física de los ácidos nucleicos de emigrar a distinta velocidad, según su peso molecular y forma o estructura molecular, a través de un gel de agarosa sujeto a un campo eléctrico.

Para la realización de la electroforesis, se utilizó una cubeta de tipo 613 x 52 Vertival Slab Unit (Shadon Southern) con un gel cuyas dimensiones eran 130 x 170 x 5 mm con doce pocillos de 15 x 10 x 5 mm.

4.1.- Método descrito por Kado y Liu (27).

a) Se inoculan 3 ml de caldo de Shapiro con una colonia de N. gonorrhoeae y 3 ml de TSB con una colonia de E. coli J53 V517, empleando para ello tubos de policarbonato y se incuban a 37° C durante toda la noche en agitación en un incubador orbital Gallenkamp.

b) Se centrifuga a 3.000 revoluciones por minuto (rpm)

y 4° C durante 7 minutos en una centrífuga Beckman modelo JA-21, usando un rotor JA-20.

c) Se decanta el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 1 ml de tampón TAE, pH 8.

d) Se añaden 2 ml de SDS al 3% en Tris 50 mM, pH 12'6.

e) Se introduce en un baño a 65° C durante 20 minutos.

f) Se extraen las proteínas añadiendo 2 volúmenes de fenol/cloroformo 1/1 (v/v), centrifugando a 6.000 rpm y a 4° C durante 15 minutos en la misma centrífuga.

g) Se transfiere la fase acuosa a otro tubo.

h) Se toman 35 ul de la fase acuosa y se mezclan con 10 ul de la solución indicadora A.

La mezcla se transfiere a un gel de agarosa al 0'8% disuelta en tampón TAE, pH 8. Los pocillos se sellan con agarosa caliente (50° C) con el fin de que no se extravase el contenido, se espera su solidificación y una vez que los compartimentos superiores e inferiores de la cubeta de electroforesis se llenan del tampón TAE, se aplica una corriente eléctrica de 100 Voltios (V) y 50 Miliamperios (mA) hasta que el frente determinado por el colorante, púrpura de bromocresol, llega al final del gel (aproximadamente 4 horas). Una vez finalizado la electroforesis, el gel se tiñe con la solución reveladora A durante 15 minutos.

Se visualiza en un transiluminador de rayos ultravioletas de onda corta tipo C61 (U.V. Products Inc. San Gabriel. California USA), fotografiándolo con una cámara Polaroid x 70 land Film, a través de un filtro rojo (Wra

tten nº 9).

El cálculo del peso molecular aproximado de los plásmidos se obtuvo mediante una recta de calibrado realizada en papel logarítmico y obtenida con los datos de los plásmidos de la cepa patrón. En abscisas se colocó la movilidad relativa de los plásmidos y en ordenadas el peso molecular de los mismos tal como puede observarse en la Figura 2.

4.2.- Método de lisis alcalina descrita por Birnboim y Doly modificada por Horowicz (28).

a) Se inoculan 1'5 ml de caldo de Shapiro con una colonia de N. gonorrhoeae y 1'5 ml de TSB con una colonia de E. coli J53 V517 y se incuba a 37° C durante toda la noche en agitación continua, como en el método anterior.

b) Se sedimentan las células bacterianas en una centrifuga Microfuge B (Beckman) a 12.000 rpm y a 4° C durante 1 minuto.

c) Se descarta el sobrenadante por aspiración y se resuspende el precipitado en 100 ul de la solución I, preparada recientemente y a la que se añade Lisozima a una concentración de 4 mg/ml justo antes de que vaya a ser utilizada.

d) Se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos.

e) Se añaden 200 ul de la solución II, de preparación reciente y se mezcla invirtiendo el tubo repetidamente 2 ó 3 veces y se mantiene en un baño de hielo, 5 minutos.

f) Se añaden 150 ul de la solución III, previamente mantenida en hielo, se agita en Vortex durante 10 segun -

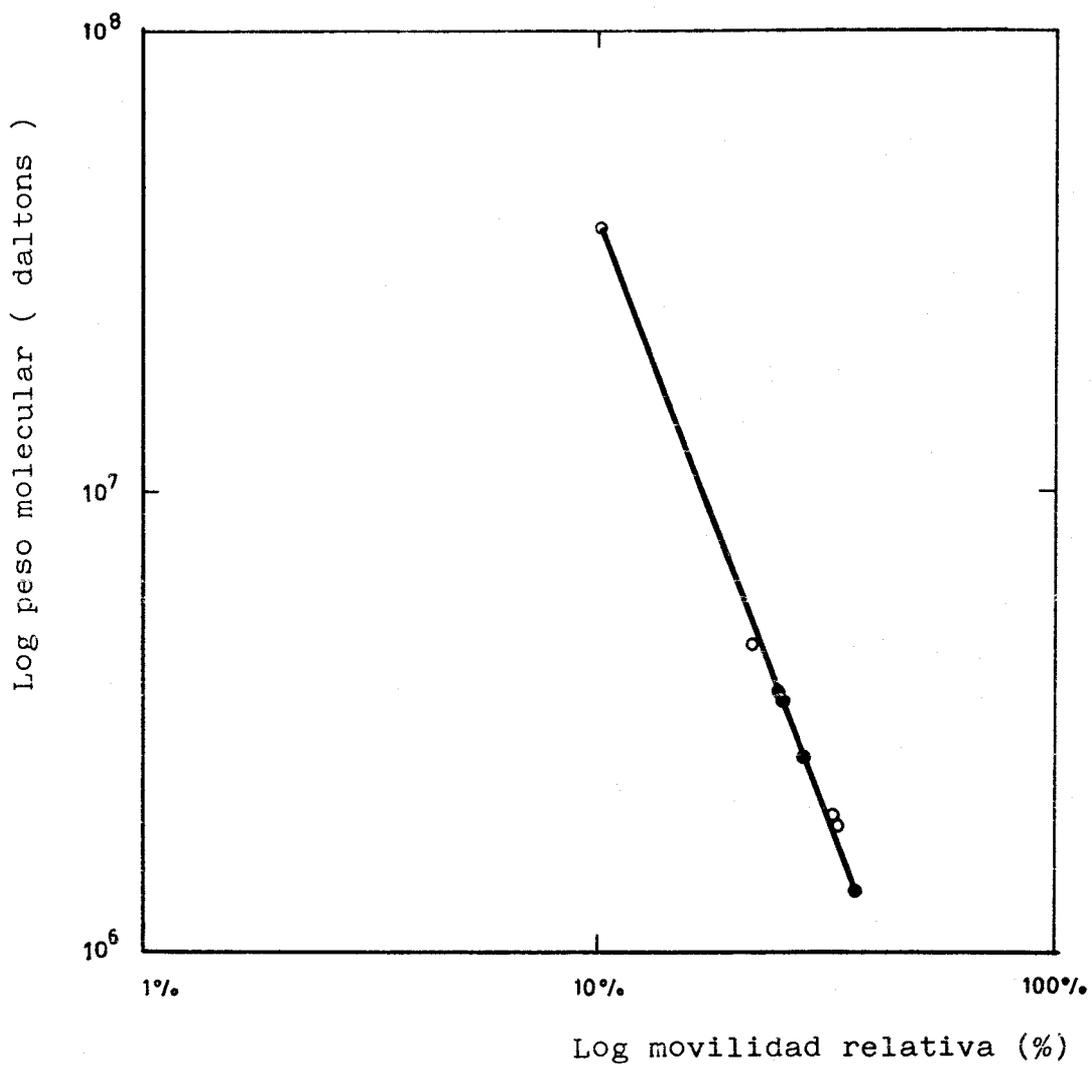


Figura 2.- Representación gráfica de la movilidad relativa en gel de agarosa al 0'8% de diversos plásmidos de peso molecular conocido, sometidos a electroforesis durante 4 horas a 100 V y 50 mA.

dos y se mantiene en hielo 5 minutos.

g) Se centrifuga durante 5 minutos en las mismas condiciones anteriores.

h) Se transfiere el sobrenadante a otro tubo y se añade un volumen igual de fenol/cloroformo 1/1 (v/v). Se mezcla con Vortex y se vuelve a centrifugar, durante 2 minutos a temperatura ambiente, depositando seguidamente la fase acuosa en otro tubo.

i) Se añade el mismo volumen de Cloroformo/Alcohol isoamílico 24/1 (v/v), se agita bien en Vortex y se centrifuga en las mismas condiciones anteriores. Se transfiere la fase acuosa a otro tubo.

j) Se añaden 2 volúmenes de Etanol a temperatura ambiente, se mezcla en Vortex y se incuba durante 2 minutos a temperatura ambiente.

k) Se centrifuga, esta vez, durante 5 minutos.

l) Se descarta el sobrenadante y se coloca el tubo en posición invertida sobre papel de filtro para que se evapore todo el Etanol residual.

m) Se añade 1 ml de Etanol al 70% para lavar el precipitado, se mezcla en Vortex y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones anteriores.

n) Se descarta el sobrenadante y se seca el precipitado en un desecador vacío-term Selecta durante 15 minutos a 37° C.

ñ) Se añaden 50 ul de tampón TE, pH 8 conteniendo Ribonucleasa (20 ug/ml), se agita en Vortex y se mezcla con

5 ul de la solución indicadora B.

o) Se realiza la electroforesis como en el método anterior, pero usando tampón TBE, pH 8'2 en vez de tampón TAE y se tiñe con la solución reveladora B.

4.3.- Método descrito por Eckhardt (29).

a) Se emulsionan una o dos colonias de N. gonorrhoeae o de E. coli J53 V517 en un tubo eppendorf que contiene 100 ul de la solución de Lisozima-Ribonucleasa y se incubaba durante 5-10 minutos a 37° C.

b) Se transfiere la mezcla anterior a los pocillos de un gel de agarosa disuelta en tampón TBE, pH 8'2 previamente montado en la cubeta de electroforesis.

c) Se añaden cuidadosamente 100 ul de la solución de SDS al 0'2% y 10% de Sacarosa en tampón TBE sobre el homogeneizado de bacterias-Lisozima-Ribonucleasa y se mezcla suavemente con un palillo estéril, moviendo de lado a lado. Se debe evitar la mezcla completa y deben permanecer distinguibles las dos capas.

d) Se añaden 200 ul de la solución de recubrimiento.

e) Se cubren los pocillos con agarosa caliente (50°).

f) El resto del proceso es igual al descrito en el método 4.1.

5.- DETERMINACION DE LOS REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES O AUXOTIPIA

Denominamos a una cepa de N. gonorrhoeae como auxotrofa cuando para su metabolismo y crecimiento, requiere

un determinado aminoácido, cofactor o vitamina, y prototrófica cuando no necesita ninguno.

La determinación de la auxotipia subdivide por lo tanto a la población bacteriana de acuerdo con su capacidad para crecer o no en un medio estándar de agar, químicamente definido, que contiene o carece de ciertos componentes.

El método empleado para la determinación del auxotipo de las cepas fue el descrito por Catlin (22) utilizando el medio NEDA como medio completo, éste permite el crecimiento aproximado del 99% de las cepas de N. gonorrhoeae aisladas de pacientes con infección gonocócica.

El medio con Cistina y Cisteína es necesario para el crecimiento de todas las cepas de N. gonorrhoeae; el hecho de detectar crecimiento en el medio NEDA completo y en el NEDA carente de Cistina, constituye una evidencia presuntiva de que el microorganismo no se trata de N. gonorrhoeae.

Para la realización de la auxotipia empleamos también el replicador de Steers y cols. pudiendo determinar, a la vez, las características nutricionales de 36 cepas bacterianas.

5.1.- Preparación de las placas: el medio completo llevó todos los componentes indicados en el apartado 4.4 y los demás se obtuvieron de la forma indicada en la tabla III.

En todos los casos, los componentes se fueron añadiendo en un matraz estéril en el orden indicado, ajustando el pH a 7'1 con Hidróxido sódico 5 N después de añadir el Acido cis-oxalacético; el pH se volvió a ajustar a 7'4

Tabla III: Medios utilizados en la determinación de la auxotipia, carentes de determinados aminoácidos, cofactores y vitaminas.

MEDIO	EXCLUIR DEL NEDA COMPLETO
Sin Prolina	Prolina de la solución nº 8
Sin Cistina	Las soluciones de L-cistina y L-cisteína hidrociorhídrica
Sin Arginina	L-arginina clorhídrica de la solución 2a
Sin Uracilo	La solución 4a
Sin Leucina	Leucina de la solución nº 8
Sin Hipoxantina	La solución 4b
Sin Lisina	Lisina clorhídrica de la solución nº 8
Sin Metionina	La solución de L-metionina
Sin Histidina	L-histidina de la solución nº 6 y la solución de L-histidina
Sin Vitaminas	Las soluciones nº 6, 7, 10 y las de Biotina y Cocarboxilasa

con Hidróxido sódico 1 N tras completar con la solución de Cocarboxilasa. Llegados a este punto, se mezcló con agar al 2%, que previamente se había esterilizado en autoclave y se había dejado enfriar hasta una temperatura de 50-55° C. Finalmente, se añadieron las soluciones de Cloruro cálcico y Nitrato férrico, se repartió en placas de Petri estériles y se dejaron solidificar.

5.2.- Preparación del inóculo: se realizó del mismo modo que el descrito en la determinación de la C.M.I.

Además de las cepas problemas, siempre incluimos tres cepas controles:

N. gonorrhoeae ATCC 27628, auxotipo 1, no requiriente

N. gonorrhoeae ATCC 27630, auxotipo 9, Pro⁻ Hyx⁻

N. gonorrhoeae ATCC 27631, auxotipo 22, Pro⁻ Met⁻ Thp⁻

5.3.- Procedimiento de replicación: fué el descrito en el apartado 3.4.

Se procedió a la lectura a las 24 y 48 horas, considerando como resultado positivo el crecimiento confluyente, semiconfluyente o la existencia de más de 10 colonias en la placa o por el contrario, se interpretó como negativo la ausencia de crecimiento o cuando aparecieron unas colonias minúsculas, de tamaño menor o igual a 0'2 mm de diámetro.

6.- REALIZACION DE LA SEROGRUPACION Y SEROTIPIA

La distinta antigenicidad de la proteína principal

de la membrana externa de N. gonorrhoeae nos permite clasificar a la población bacteriana en dos grandes serogrupos: WI y WII/III, dentro de los cuales, podemos desglosar diversos serotipos.

Para la realización de esta clasificación serológica, se utilizó la técnica de coagulación que se basa en la capacidad que tiene la proteína A de las cepas de S. aureus de fijar las moléculas de inmunoglobulina G, unión que se lleva a cabo a través de la fracción Fc de la inmunoglobulina, quedando libre la fracción Fab de la misma para unirse al antígeno, tal como podemos apreciar en la Figura 3.

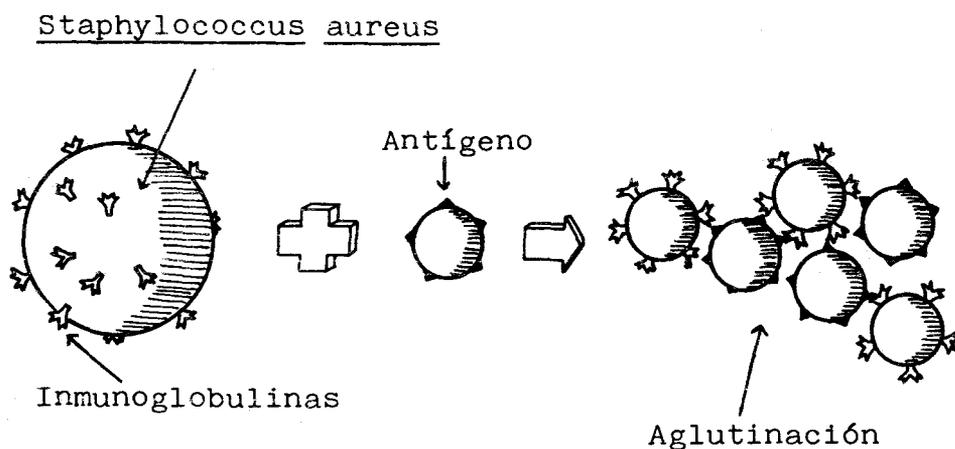


Figura 3.-Representación de la reacción de coagulación.

En nuestro caso, el antígeno lo constituían distintos determinantes antigénicos de la proteína principal de la membrana externa de N. gonorrhoeae y las inmunoglobulinas, anticuerpos monoclonales específicos para los epítopos de la proteína principal de la membrana externa de N. gonorrhoeae.

Se emplearon dos sistemas de anticuerpos monoclonales:

1.- Sistema elaborado por Knapp y cols. que comprende 14 antisueros denominados por este orden:

* f, e, d, g, k, i y h. Estos antisueros reaccionan ante cepas de N. gonorrhoeae que tienen una variedad de la proteína principal de la membrana externa, denominada A, y que las hace pertenecer al serogrupo WI.

* a, c, e, g, j, h y k. Estos antisueros reaccionan ante los diferentes epitopos de la proteína principal de la membrana externa, denominada B que clasifica a las cepas que la poseen en el serogrupo WII/III.

2.- Sistema Ph elaborado por Bygdeman y cols. formado también por 14 antisueros denominados:

* r, o, s, t y v que definen a las cepas del serogrupo WI y

* r, o, p, y, v, u, s, t y x que clasifica a las cepas de N. gonorrhoeae como pertenecientes al serogrupo WII/III.

Cada forma, A o B, de la proteína principal de la membrana externa excluye a la otra, así que una cepa pertenecerá a un serogrupo o a otro, pero no a los dos.

El serotipo dentro de cada serogrupo, vendrá determinado por el conjunto de los diferentes antisueros frente a los que reaccionen las cepas.

6.1.- Preparación del inóculo: se obtuvo a partir de un cultivo puro de N. gonorrhoeae inoculada en placas con medio de Kelloggs, de no más de 18-24 horas de incubación. Se realizó una suspensión de las células en tampón fosfato, pH 7'5 hasta alcanzar una turbidez visible, equivalen

te a la de los anticuerpos monoclonales empleados.

Esta suspensión se sometió a 100° C en baño, durante 10 minutos con la finalidad de desnaturalizar los componentes bacterianos.

6.2.- Realización de la prueba: se efectuó en placas Bioplate^R tipo II, bajo un fondo oscuro. Después de poner en cada pocillo 50 ul de cada uno de los anticuerpos monoclonales, se añadió a cada pocillo, el mismo volumen de la suspensión de la bacteria a estudiar, se mezcló con un movimiento continuo de vaivén vertical de la placa y se procedió a la lectura.

6.3.- Lectura: se hizo a lo largo de los dos minutos siguientes, una vez mezclado el antígeno con el anticuerpo y bajo luz oblicua incidente. La valoración de las distintas aglutinaciones fue:

- +++ Aglutinación inmediata y fuerte
- ++ Aglutinación en el primer minuto y evidente
- + Aglutinación tardía y poco evidente

6.4.- Como controles se emplearon dos cepas patrones de N. gonorrhoeae U51, serotipo Afegk y N. gonorrhoeae 4412, serotipo Baej.

7.- AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL ADN

7.1.- Para el aislamiento del ADN se emplearon dos métodos con el fin de escoger el más idóneo:

7.1.1.- Método descrito por Cornelis y cols. (30).

- a) Se inoculan 10 ml del medio líquido de Shapiro con una colonia de N. gonorrhoeae hasta alcanzar una turbidez igual al nº 1 de la escala de Mc. Farland.
- b) Se inoculan 500 ml del mismo medio con 0'1 ml de la suspensión anterior, incubando durante 18 horas a 37° C en agitación continua.
- c) Se centrifuga a 4.000 rpm a 4° C durante 15 minutos en una centrífuga Beckman J-21 empleando un rotor JS-7'5 y con contenedores de polipropileno de 260 ml.
- d) Se resuspende el precipitado en 10 ml de tampón de Sacarosa al 25% en Tris 0'05 M, pH 8 y se transfiere a tubos de policarbonato de 45 ml, se guarda a -20° C para permitir la lisis adecuada de las células.
- e) Una vez descongelada la solución, se añaden 2 ml de una solución de Lisozima en Tris 0'25 M, pH 8 (5 mg/ml), incubando en hielo durante 15 minutos.
- f) Se añaden 6 ml de EDTA Na₂ 0'2 M, pH 8 y se incuba a 0° C durante 5 minutos.
- g) Se agregan 10 ml de Triton X-100 al 2% (v/v) en Tris 0'05 M, pH 8/EDTA Na₂ 0'05 M, pH 8.
- h) Se centrifuga a 18.000 rpm y a 4° C durante 1 hora en una centrífuga Beckman J-21, usando un rotor JA-20.
- i) Se transfiere el sobrenadante a otro tubo, se añaden 3'5 ml de ClNa 5 M y 8 ml de Polietilenglicol al 50% (p/v) y se mantiene a 4° C durante toda la noche.
- j) Se centrifuga en las mismas condiciones anteriores

durante 15 minutos.

k) Se descarta el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 6 ml de tampón TE, pH 8.

l) Se transfiere la suspensión a tubos de polipropileno de 45 ml, se añaden 3 volúmenes de Cloroformo y se centrifuga durante 1 minuto como anteriormente.

m) Se transfiere la interfase (6 ml) a otro tubo de polipropileno y se repite el paso " l " dos veces más.

n) Se deja evaporar el Cloroformo residual, agitando ocasionalmente.

7.1.2.- Método de lisis alcalina descrita por Birnboim y Doly y modificada por Horowicz (28).

a), b) y c) se procede igual que en el método anterior.

d) Se resuspende el precipitado bacteriano en 10 ml de solución I, preparada recientemente, a la que se adiciona Lisozima a una concentración de 5 mg/ml. Esta solución debe mantenerse en un baño de hielo hasta su utilización.

e) Se transfiere la solución a un tubo de polipropileno de 45 ml y se mantiene a temperatura ambiente durante 5 minutos.

f) Se añaden 20 ml de solución II, de preparación reciente y se incuba en un baño de hielo durante 5 minutos.

g) Se añaden 15 ml de solución III, se mezcla invirtiendo el tubo varias veces y se incuba en las mismas condiciones durante 10 minutos.

h) Se centrifuga a 18.000 rpm durante 20 minutos a 4° C en una centrífuga Beckman J-21 con un rotor JA-20.

i) Se transfiere el sobrenadante a otro tubo de poli-propileno, se añaden 0'6 volúmenes (12 ml) de Isopropanol, se mezcla bien en Vortex y se mantiene a temperatura ambiente durante 15 minutos.

j) Se centrifuga a 12.000 rpm y temperatura ambiente durante 30 minutos como en " h ".

k) Se descarta el sobrenadante y se lava el precipitado con Etanol al 70% a temperatura ambiente. Se deja evaporar el Etanol colocando los tubos en posición invertida sobre papel de filtro y se disuelve el precipitado en 6 ml de tampón TE, pH 8.

7.2.- Purificación del ADN por gradiente de densidad de Cloruro de cesio con Bromuro de etidio (30).

a) A los 6 ml de solución donde se encuentra el ADN, se añaden 6 g de Cloruro de cesio, agitando hasta su disolución.

b) Se adicionan 0'3 ml de una solución de Bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml en tampón TE, pH 8. Este compuesto se intercala en las bases del ADN y permite visualizarlo cuando se ilumina con luz ultravioleta.

c) Se lleva a una densidad de 34'5-35'5 valiéndonos de un refractómetro de azúcares (Bausch & Lomb) usando solución de Cloruro de cesio para aumentar la densidad o tampón TE, pH 8 para disminuirla.

d) Se transfiere a tubos de polipropileno de 12 ml, se equilibran sus pesos y se centrifugan a 4° C y 42.000 rpm

en una ultracentrífuga Beckman L5-65 con rotor 50 Ti durante 40 horas.

e) Se visualiza el contenido del tubo con una fuente de luz ultravioleta de onda larga (U.V. Products Inc San Gabriel. California USA) que evita la rotura de las cadenas de ADN que produce la luz ultravioleta de onda corta. En el tubo deben observarse dos bandas, una superior y otra inferior que es el ADN plásmidico (Figura 12); esto es debido a que el Bromuro de etidio se une más a la forma abierta del plásmido y del ADN lineal (ADN cromosómico), que a la forma cerrada del ADN plasmídico: cuando el ADN se somete a un gradiente de densidad de Cloruro de cesio, el cesio es desplazado por el Bromuro de etidio y entonces el ADN lineal se hace menos denso que el plasmídico en su forma cerrada.

f) Se recoge la banda inferior con una jeringa provista de aguja, tratando de no tomar nada de la banda superior.

g) Se extrae el Bromuro de etidio añadiendo un volumen de Isobutanol, se agita vigorosamente y se elimina la fase superior. Esta operación se repite hasta que desaparezca todo el color rosa del Bromuro de etidio.

h) Se somete la solución a diálisis frente a tampón TE pH 8 durante 30 minutos, con el fin de eliminar el Cloruro de cesio. Previamente se ha de hervir la bolsa de diálisis durante 10 minutos en una solución de Bicarbonato sódico al 2% y EDTA Na₂ 1 mM y después otros 10 minutos en agua destilada para eliminar el azufre contenido en su composición. La diálisis concluye una vez cambiado el tampón 3 veces.

8.- EXTRACCION DE LOS PLASMIDOS DEL GEL DE AGAROSA

1) Se somete la solución conteniendo el ADN a electroforesis horizontal sumergida. El gel de agarosa al 1% en tampón TBE, pH 8'2, tiene unas dimensiones de 14'5 x 14'5 x 0'5cm con un pocillo único de 9'5 x 0'5 x 0'5 cm, y la corriente eléctrica que se aplica es de 70 V y 40 mA durante 4 horas.

2) Se cortan las dos piezas del gel que delimitan lateralmente el pocillo, se tiñen con la solución reveladora B y se visualizan las bandas del ADN en un transiluminador horizontal de luz ultravioleta de onda corta.

3) Se señalan los niveles donde se encuentran las bandas, se transfieren estas señales al gel y se corta por dichos niveles. Esta operación se realiza con la finalidad de no someter a todo el ADN a la acción de la luz ultravioleta de onda corta.

4) Para la extracción del ADN del gel empleamos varios métodos para elegir el más eficaz.

4.1.- Método de extracción mediante congelación-descongelación (31).

a) Con una jeringuilla, se reparte la pieza del gel donde se encuentra el ADN a extraer en tubos eppendorf, se equilibran éstos con tampón TBE, pH 8'2 y se agitan con Vortex durante 1 minuto.

b) Se colocan a -70° C durante 15 minutos.

c) Se descongelan durante 1-2 minutos y se centrifugan en una centrífuga Microfuge a 12.000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente.

d) Se toma rápidamente la fase líquida con una jeringuilla y aguja y se transfiere a un tubo de policarbonato de 12 ml.

e) Se añade 1 volumen de tampón TBE a cada tubo eppendorf que contiene la agarosa y se agita con Vortex durante 1 minuto.

f) Se repiten los pasos b), c) y d) dos veces más, depositando las fases líquidas obtenidas en el mismo tubo anterior, y el paso e) una sola vez.

g) Se precipita el ADN con 1/9 volumen de Acetato sódico 4 M y 2 volúmenes de Etanol absoluto a -20° C.

h) Se coloca a -70° C durante 1 hora.

i) Se centrifuga a 12.000 rpm y a 4° C durante 30 minutos en una centrífuga Beckman J-21 con un rotor JA-20.

j) Se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 200 μ l de tampón TE, pH 8.

4.2.- Método de extracción mediante electroforesis (electroelución) vertical (32).

a) Se prepara el dispositivo para someter al ADN que se encuentra en la pieza del gel a electroforesis vertical, para ello:

1) Se introducen fibras de vidrio en una pipeta de plástico hasta el punto donde se estrecha.

2) Se coloca una bolsa de diálisis en el extremo de la pipeta y se ata a ésta, posteriormente se rellena la bolsa con tampón TBE, pH 8'2.

b) Se introduce la pieza de agarosa en la pipeta y se rellena el resto de la pipeta con tampón TBE, pH 8'2.

c) Se coloca este dispositivo en una cubeta de electroforesis vertical, tal como se puede apreciar en la Figura 4.

d) Se rellenan los compartimentos superiores e inferiores de la cubeta de electroforesis con tampón TBE, pH 8'2.

e) Se coloca un puente realizado con un cilindro de vidrio de pequeño diámetro entre el compartimento superior de la cubeta y la boca de la pipeta.

f) Se somete a una corriente eléctrica de 500 V y 10 mA durante toda la noche.

g) Se invierte el sentido de la corriente durante 5 minutos.

h) Se extrae el líquido de la bolsa de diálisis, se transfiere a un tubo y se precipita del mismo modo que en el método anterior.

4.3.- Método de extracción mediante membrana de diálisis (33).

a) En este caso se obvian los pasos 2) y 3) del apartado 8 y, en cambio, se tiñe el gel con la solución reveladora de Bromuro de etidio durante 15 minutos. Se localiza el ADN mediante luz ultravioleta lo más rápidamente posible para evitar la alteración del ADN.

b) Se hace una incisión en el gel de agarosa, inmediatamente delante del lugar donde se encuentra la banda de

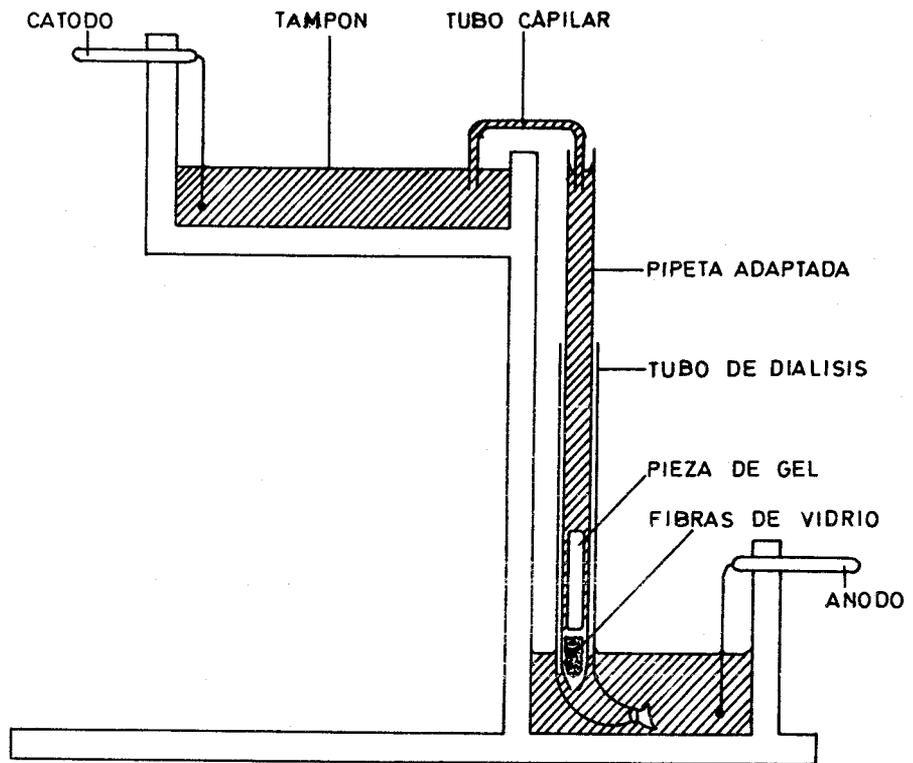


Figura 4.- Dispositivo utilizado para la realización de electroforesis vertical con la finalidad de extraer el ADN del gel de agarosa.

ADN, la anchura de dicha incisión ha de ser de 2 mm.

c) Se corta una pieza de papel Whatman 3MM y otra de una membrana de diálisis simple, del mismo grosor y de la misma longitud que el gel donde se encuentra el ADN y se sumergen ambas en tampón TBE, pH 8'2 durante 5 minutos.

d) Se pone el papel con la membrana adosada a su pared posterior, inmediatamente delante de la banda de ADN.

e) Se cierra completamente la incisión con agarosa a 50° C, sin dejar burbujas.

f) Se realiza electroforesis a 70 V y 40 mA hasta que el ADN haya emigrado al papel y, en ese momento, se interrumpe la corriente eléctrica.

g) Se extrae el papel y se coloca en una bolsa de diálisis, haciendo contactar la cara que se enfrentó primero a la corriente eléctrica con la cara anterior de la bolsa, se rellena ésta con tampón TBE, pH 8'2 y se cierra.

h) Se introduce la bolsa en un gel de agarosa, de modo que quede completamente sumergida en el mismo y se hace pasar de nuevo la corriente eléctrica a 70 V y 40 mA durante 1 hora.

i) Se invierte la corriente eléctrica y se mantiene durante 5 minutos.

j) Se extrae el tampón de la bolsa con una jeringa y se transfiere a un tubo.

k) Se procede a la precipitación del ADN como en los métodos anteriores.

9.- TRATAMIENTO DE LOS PLASMIDOS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

El método fue el descrito por Maniatis (34).

a) Se parte de una solución de ADN que lleva 0'2-1 ug del mismo en 18 ul de tampón TE, pH 8 en un tubo eppendorf estéril. Para calcular la concentración del ADN, comparamos ésta con una gama de diluciones en base diez de ADN del fago Lambda, partiendo de una concentración inicial de 385 ug/ml; para ésto se colocan 2 ul de cada solución en un gel de agarosa hecho sobre un portaobjetos, se deja secar, se tiñe con la solución reveladora B y se visualiza con un transiluminador de onda corta.

b) Se añaden 2 ul del tampón de digestión (10 X) y se mezcla en Vortex.

c) Se adiciona 1 ul del enzima de restricción y se mezcla de nuevo en Vortex.

d) Se incuba a 37° C en un baño de agua, con el fin de que no haya oscilaciones de temperatura que afecte a la acción del enzima durante un periodo de 1 hora.

e) Se detiene la reacción adicionando EDTA Na₂ 0'5 M, pH 7'5 a una concentración final 10 mM.

f) Se añaden 6 ul de solución indicadora C y se mezcla en Vortex.

g) Se somete a electroforesis sumergida en gel de agarosa al 1% en tampón TBE, pH 8'2, con unos pocillos de 0'5 x 0'5 x 2 cm, aplicándole una corriente eléctrica de 70 V y 40 mA durante 4 horas.

h) Se tiñe el gel con la solución reveladora B durante 10-15 minutos y se visualiza con un transiluminador de luz ultravioleta horizontal. Si es necesario se destiñe con una solución de Sulfato magnésico 1 mM durante 1 hora a temperatura ambiente.

i) Se fotografía el gel con una cámara Polaroid x 70 land Film, a través de un filtro rojo (Wratten nº 9).

10.- TRANSFORMACION DE E. COLI CON ADN PLASMIDICO

El método que utilizamos fue el de Cloruro cálcico descrito por Mandel (35).

a) Se inoculan 5 ml de Caldo Tripticasa Soja con una colonia de E. coli C600 y se incuba durante toda la noche a 37° C.

b) Se inoculan 100 ml del mismo medio, en un matraz de 500 ml, con 1 ml del cultivo y se incuba a 37° C, en agitación, durante 2 horas. Se reparten los 100 ml en 4 tubos.

c) Se coloca el cultivo en hielo durante 5 minutos y se centrifuga durante 5 minutos a 3.000 rpm y 4° C en una centrífuga Beckman J-21 con un rotor JA-20.

d) Se descarta el sobrenadante y se resuspenden las células bacterianas en 0'5 volúmenes (12'5 ml) de una solución de Cloruro cálcico 50 mM y Tris 10 mM, pH 8, fría.

e) Se coloca en un baño de hielo durante 15 minutos.

f) Se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones anteriores durante 5 minutos.

g) Se elimina el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 1/15 volúmenes (1'66 ml) de la misma solución.

h) Se reparte en alícuotas de 0'2 ml en tubos eppendorf estériles y se mantienen a 4° C durante toda la noche.

i) Se añade el ADN que ha de estar a una concentración de hasta 40 ng en 100 ul de tampón TE, pH 8, a uno de los tubos anteriores. La medición de la concentración del ADN se realizó del mismo modo que en el apartado nº 9. Se mantiene el tubo en hielo durante 30 minutos.

j) Se deja un tubo sin ADN, como control.

k) Se incuban los tubos en un baño a 42° C durante 2 minutos.

l) Se añade 1 ml de Caldo Tripticasa Soja a cada tubo y se incuba a 37° C durante 60 minutos.

m) Se extiende 0'1 ml de la suspensión celular en placas de Mueller-Hinton con y sin el antimicrobiano selectivo a la concentración deseada, en nuestro caso: Ampicilina (8 ug/ml), Trimetoprim (8 ug/ml) y Ampicilina más Trimetoprim (8 ug/ml cada uno).

n) Se incuban las placas a 37° C durante toda la noche.

ñ) Se examinan las placas para detectar los transformantes, contar las colonias y determinar así la frecuencia de transformación de cada fenotipo.

o) Se subcultivan las colonias para verificar la estabilidad fenotípica en placas de Mueller-Hinton con cada an

timicrobiano.

p) Se extrae y purifica el ADN plasmídico de las cepas transformadas mediante el método de lisis alcalina y se hace correr éste en electroforesis en gel de agarosa, se tñe con la solución reveladora B durante 15 minutos y se visualizan los plásmidos con un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta.

q) Se mantienen los transformantes a -70° C.

11.- ESTUDIOS DE HIBRIDACION DEL ADN PLASMIDICO

Se utilizó el sistema Orgenic's Chemiprobe tm. y se aplicaron dos técnicas de hibridación.

1.- Directa, a partir de una solución de ADN.

2.- Transferencia por absorción en membrana de Nitrocelulosa, descrita por Southern (Southern blot) (38).

El sistema Orgenic's Chemiprobe tm. consiste esquemáticamente en:

a) Desnaturalizar el ADN que vamos a utilizar como detector. Esto se lleva a cabo, calentando la solución que lleva el ADN durante 10 minutos y enfriándolo rápidamente en hielo, así se evita que se vuelvan a unir las dos cadenas de ADN que se han separado con el calor.

b) Modificar el ADN químicamente mediante la introducción en su cadena, concretamente en la base Citosina, de grupos antigénicos sulfónicos, para ello, se adiciona una solución de Bisulfito sódico de alta molaridad (Sol. A) y otra solución estabilizadora de Metilhidroxilamina (So

lución B).

c) Unir el ADN problema desnaturalizado a una membrana de Nitrocelulosa, sometiéndolo a 80° C durante 2 horas en vacío.

d) Prehibridar el ADN problema, una vez fijado en la membrana, con ADN de E. coli desnaturalizado, a 68° C y durante 2 horas, con el fin de evitar reacciones inespecíficas.

e) Llevar a cabo la reacción de hibridación a 68° C durante 12-24 horas, usando el ADN previamente modificado.

f) Impregnar la membrana con una solución bloqueante para prevenir las reacciones inmunes inespecíficas.

g) Enfrentar la membrana con anticuerpos monoclonales específicos anti-ADN modificado y posteriormente con una antigammaglobulina a la que va unida la Fosfatasa alcalina.

h) Visualizar la hibridación valiéndonos de un sustrato cromogénico soluble consistente en Nitroazul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato, que es convertido por el enzima en un tinte insoluble que precipita en el lugar exacto de la reacción inmune.

11.1.- Hibridación directa a partir de una solución de ADN

a) Se diluye el ADN que se vaya a usar como sonda (secuencias de ADN o ARN marcadas con indicadores, que pueden unirse a cadenas de ADN o ARN que poseen secuencias complementarias) con agua o tampón TE, pH 7.5 hasta una

concentración final de 5-500 ug/ml.

b) Se desnaturaliza el ADN con calor tal como ha sido previamente explicado.

c) Se añaden 500 ul de la solución de modificación A a 100 de la solución de ADN y se mezcla bien en Vortex.

d) Se adicionan 125 ul de la solución de modificación B y se mezcla de nuevo en Vortex.

e) Se incuba a temperatura ambiente durante 2 horas.

f) Se colocan 10 ul de la solución conteniendo el ADN problema, desnaturalizado, en una membrana de Nitrocelulosa y se deja secar durante 10-15 minutos.

g) Como control positivo de la sonda, se coloca en la membrana, 2 ul del mismo sin modificar y desnaturalizado, y como control positivo de la reacción de modificación, otros 2 ul de ADN de esperma de salmón, modificado y desnaturalizado, se deja secar durante 10-15 minutos.

h) La membrana se incuba en vacío a 80° C durante 2 horas.

i) Se coloca la membrana en una bolsita de plástico y se le añade 50 ul/cm² de membrana de la solución de pre-hibridación consistente en: SSC (6 X), Denhardt (5 X) SDS 0'1% y 100 ug/ml de ADN de E. coli desnaturalizado. Se cierra la bolsa con un sellador de bolsas al calor Melita, y se incuba a 68° C durante 2 horas.

j) Se coloca la membrana en otra bolsita y se hibrida el ADN modificado con el ADN problema, en una solución i-

igual a la anterior pero sin el ADN de E. coli, poniendo 50 ul/cm² de membrana, se sella la bolsa evitando que queden burbujas y se incuba a 68° C durante 12-24 horas.

k) Se lava con SSC (2 X) y SDS 0'5% durante 5 minutos.

l) Se lava con SSC (2 X) y SDS 0'1% durante 20 minutos.

m) Se lava con SSC (0'1 X) y SDS 0'1% durante 30 minutos.

n) Se seca la membrana colocándola sobre papel Whatman 3MM, cuidándonos de que la cara de la membrana que contacte con el papel no sea la reactiva.

ñ) Se transfiere la membrana a otra bolsita de plástico y se añade solución bloqueante en un volumen de 50 ul/cm² de membrana. Se cierra la bolsa y se mantiene a temperatura ambiente en agitación continua durante 1 hora.

o) Se descarta la solución y se añade el anticuerpo contra el ADN modificado diluido en solución bloqueante, en una proporción de 1:100, en una cantidad de 50 ul/cm² de membrana, se sella la bolsa y se incuba a temperatura ambiente con agitación.

p) Se lava la membrana tres veces con la solución de lavado nº 1, cada lavado ha de ser de 15 minutos y se requiere un volumen de 3 ml/cm² por lavado.

q) Se coloca la membrana en otra bolsa y se añade la Fosfatasa alcalina unida a la antigammaglobulina diluida en la solución bloqueante en una proporción 1:100, 50 ul/

cm² de membrana. Se cierra la bolsita y se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora en agitación.

r) Se efectúan tres lavados de 20 minutos con la misma solución.

s) Se lava dos veces durante 10 minutos con la solución de lavado nº 2.

t) Se coloca la cara no reactiva de la membrana sobre papel Whatman 3MM durante 2 minutos.

u) Se transfiere la membrana a otra bolsa de plástico y se añaden 50 ul/cm² de membrana de la solución del sustrato cromogénico, se sella la bolsa y se incuba en oscuridad durante 15-30 minutos. Si no aparece inmediatamente el color, se prolonga la incubación hasta 1 hora.

v) Se fotografía o aún mejor, se fotocopian los resultados, pues así se puede aumentar el contraste.

11.2.- Hibridación Southern blot.

Se empleó para detectar hibridación del ADN extracromosómico de la cepa problema, sin tener que individualizar y extraer los plásmidos del gel de agarosa.

a) Se somete el ADN de la cepa problema a electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% empleando tampón TBE, pH 8.2 y corriente eléctrica de 70 V y 40 mA, durante 4 horas.

b) Se tiñe el gel con la solución reveladora B durante 15 minutos.

c) Se expone el gel a luz ultravioleta de onda corta

durante 10 minutos para visualizar las bandas de ADN y romper sus cadenas. Se superpone un papel transparente en el gel, dibujando en aquel las bandas con el fin de tener referencia de su localización.

d) Se cortan y se desechan todas las porciones laterales del gel que no contengan ADN.

e) Se sumerge el gel en una solución de Cloruro sódico 1'5 M e Hidróxido sódico 0'5 M durante 1 hora, para desnaturar el ADN; esta solución se cambia varias veces.

f) Se coloca el gel en una solución de Cloruro sódico 1'5 M y Tris 1 M, pH 8, que se renovará varias veces.

g) Se transfiere el ADN a papel de Nitrocelulosa para lo cual, y tal como podemos apreciar en la Figura 5, se procede del siguiente modo:

- Se corta un trozo de papel Whatman 3MM de un tamaño tal que cubra todo el gel y en los laterales quede cantidad suficiente para hacer contactar el tampón SSC (10 X) existente en la cubeta donde se va a colocar el gel.

- Se coloca el papel sobre un soporte ubicado en el interior de la cubeta.

- El gel de agarosa se sitúa encima del papel.

- Encima del gel se coloca un plástico al que le falta la superficie correspondiente a aquel.

- Sobre el plástico se pone una pieza de membrana de Nitrocelulosa cuya superficie es de 1-2 mm mayor que la del gel; previamente esta membrana se debe mojar en tam-

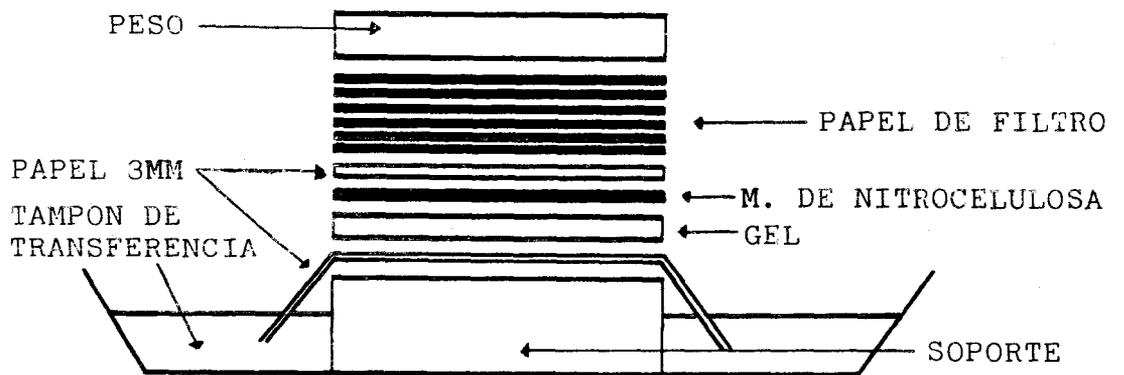


Figura 5.- Esquema de la transferencia del ADN desde el gel de agarosa a una membrana de Nitrocelulosa según el método de Southern.

pón SSC (2 X) y se ha de mantener empapada durante 2 minutos.

- Encima de la membrana se superpone un trozo de papel Whatman doble, de un tamaño algo menor que el de la membrana de Nitrocelulosa.

- Encima de todo se coloca una pila de papel de filtro de unos 8 cm de altura y una pesa de 1/2 Kg.

- Se vierten 2 litros de tampón SSC (10 X) en la cubeta y se espera hasta que el papel de filtro se impregne con la mayor cantidad de tampón posible, momento este en el que el ADN habrá pasado al papel de Nitrocelulosa.

i) El ADN se fija en la membrana incubándola a 80° C en vacío durante 2 horas.

j) El papel de Nitrocelulosa se corta en pequeñas tiras con el fin de que cada una nos sirva para la prueba de hibridación con el ADN elegido.

k) El proceso de hibridación se continúa como describimos anteriormente.

12.- ESTUDIOS ESTADISTICOS

Para la evaluación de datos cualitativos empleamos el test de Chi-cuadrado de Mantel y Haenszel y el test exacto de Fisher cuando alguno de los valores fue menor o igual a 5.

RESULTADOS

Las 116 cepas de N. gonorrhoeae procedían de 107 pacientes, de ellos, 62 fueron varones heterosexuales, 14 varones homosexuales y 31 mujeres heterosexuales.

Las muestras tuvieron distinta procedencia: 78 (67'24%) fueron obtenidas de uretra, 33 (28'44%) de endocérvix, 4 (3'44%) de recto y 1 (0'86%) de faringe.

En 4 varones heterosexuales, 3 mujeres y 1 varón homosexual se aisló, por dos veces, N. gonorrhoeae. El intervalo entre los dos aislamientos fue de 7 días, momento

en el cual acuden sistemáticamente los pacientes a control. En 1 mujer se aisló N. gonorrhoeae en 3 localizaciones: endocérvix, recto y faringe.

1.- PRODUCCION DE PENICILINASA

De las 116 cepas, 14 (12%) fueron productoras de penicilinasa, teniendo que considerar que en 2 pacientes se aisló N. gonorrhoeae productora del enzima tanto en la primera como en la segunda visita. El tratamiento de elección con Penicilina, que se instauró antes del aislamiento, en estos dos casos resultó, como es lógico, ineficaz.

Los datos epidemiológicos de las cepas productoras de penicilinasa así como el tratamiento que se instauró en cada caso se encuentran en la tabla IV.

Como puede apreciarse, las 14 cepas productoras de penicilinasa se aislaron en 9 pacientes varones (75%) y en 3 mujeres (25%). En 3 pacientes se pudo establecer un tratamiento correcto y seguimiento del contacto, así como su tratamiento eficaz; en los 6 pacientes restantes, sólo se logró instaurar un buen tratamiento en ellos pero no fue posible el seguimiento de los contactos, por tanto, podemos decir que no se consiguió un control total del brote infeccioso producido por estas cepas resistentes a Penicilina.

2.- DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A AGENTES ANTIMICROBIANOS

Los resultados obtenidos en la determinación de la sensibilidad a diversos agentes antimicrobianos de las cepas de N. gonorrhoeae se encuentran en las tablas V y VI.

Tabla IV: Datos epidemiológicos y tratamiento de los pacientes infectados por cepas de N. gonorrhoeae productoras de penicilinas.

Cepa nº	Sexo/Pref. sexual	Lugar aislamiento	Nº de la pareja	Tratamiento
21/85	Varon heterosexual	Uretra		Penicilina
29/85		Uretra		Espectinomicina
26/85	Varon heterosexual	Uretra	30/85	Espectinomicina
30/85	Mujer heterosexual	Endocervix	29/85	Espectinomicina
34/85	Varon heterosexual	Uretra		Espectinomicina
46/85	Varon heterosexual	Uretra		Penicilina
49/85		Uretra		Ofloxacina
57/85	Varon heterosexual	Uretra		Ofloxacina
3/86	Varon heterosexual	Uretra		Espectinomicina
11/86	Varon heterosexual	Uretra		Ofloxacina
19/86	Varon heterosexual	Uretra	21/86	Ofloxacina
21/86	Mujer heterosexual	Endocervix	19/86	Espectinomicina
41/86	Mujer heterosexual	Endocervix	43/86	Espectinomicina
43/86	Varon heterosexual	Uretra	41/86	Ofloxacina

Tabla V: Porcentajes acumulativos de inhibición de las 116 cepas de N. gonorrhoeae a la acción de 7 agentes antimicrobianos.

		Concentraciones (ug/ml)																
		0'00045	0'0009	0'0018	0'0037	0'0075	0'015	0'03	0'06	0'12	0'25	0'5	1	2	4	8	16	
PENICILINA	NGPP															43	93	100
	NGNPP						8	23	68	93	97	99	99	100				
TETRACICLINA	NGPP														43	79	100	
	NGNPP									1	5	63	99	100				
ESPECTINOMICINA	NGPP																	100
	NGNPP															29	100	
ERITROMICINA	NGPP							7	79	93	100							
	NGNPP						5	24	78	97	100							
CEFTRIAXONA	NGPP		14	57	86	100												
	NGNPP	1	9	46	94	100												
CIPROFLOXACINA	NGPP		14	79	100													
	NGNPP		31	64	92	96	96	100										
OFLOXACINA	NGPP						21	100										
	NGNPP					2	51	94	95	98	100							

Tabla VI: Valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ en ug/ml de los distintos agentes antimicrobianos estudiados ante las dos poblaciones de N. gonorrhoeae.

Agente antimicrobiano	CMI ₅₀	CMI ₉₀
NGPP	8	8
PENICILINA		
NGNPP	0'06	0'125
NGPP	4	8
TETRACICLINA		
NGNPP	1	2
NGPP	16	16
ESPECTINOMICINA		
NGNPP	16	16
NGPP	0'06	0'125
ERITROMICINA		
NGNPP	0'06	0'125
NGPP	0'0018	0'0075
CEFTRIAXONA		
NGNPP	0'0018	0'0037
NGPP	0'0018	0'0037
CIPROFLOXACINA		
NGNPP	0'0018	0'0037
NGPP	0'03	0'03
OFLOXACINA		
NGNPP	0'015	0'03

Todos los agentes antimicrobianos estudiados se comportaron de un modo semejante tanto frente a las cepas productoras como no productoras de penicilinas, a excepción de Penicilina. También Tetraciclina se comportó de forma distinta, aunque tal diferencia no fue significativa.

Las concentraciones de Penicilina que inhibió al 90% de las cepas productoras de penicilinas fue de 8 ug/ml, mientras que las no productoras se inhibieron con 0'125 ug/ml.

Dentro de las 102 cepas no productoras de penicilinas, 76 (74'5%) se inhibieron a una concentración de Penicilina que osciló entre 0'05 y 0'5 ug/ml, pudiéndose considerar relativamente resistentes a este agente antimicrobiano. 3 (2'9%) cepas se inhibieron a una concentración de Penicilina igual o mayor a 0'5 ug/ml, siendo por lo tanto cromosómicamente resistentes a este agente antimicrobiano.

Tetraciclina presentó unos valores de CMI_{50} y CMI_{90} superiores en 2 diluciones frente a las cepas productoras de penicilinas que ante las no productoras del enzima (37'25%) fueron relativamente resistentes ($CMI = 2-4$ ug/ml) mientras que el porcentaje de éstas en la población de cepas productoras de penicilinas fue del 92'85%.

Espectinomicina mostró la misma actividad ante las cepas productoras y no productoras de penicilinas, presentando unas CMI_{50} y CMI_{90} de 16 ug/ml.

Eritromicina inhibió al 90% de las cepas productoras y no productoras de penicilinas a una concentración de 0'125 ug/ml, no existiendo ninguna cepa resistente a

este agente antimicrobiano.

Los agentes antimicrobianos más activos frente a las cepas de N. gonorrhoeae estudiadas fueron Ceftriaxona y Ciprofloxacina cuyos valores de CMI_{90} ante las cepas productoras del enzima inactivante fue de 0'0075 y 0'0037 ug/ml respectivamente y, ante las cepas no productoras, de 0'0037 ug/ml en ambos casos.

Ofloxacina fue menos activa que el otro derivado quinoleínico estudiado (Ciprofloxacina), presentando una CMI_{90} de 0'03 ug/ml para los dos tipos de cepas (superiores en tres diluciones a la CMI_{90} de Ciprofloxacina).

3.- DETECCION DE LOS PLASMIDOS Y CALCULO DE SUS PESOS MOLECULARES

De los métodos utilizados para el análisis plasmídico, el que nos ofreció mejores resultados fue el de Eckhardt (resultados no mostrados) y éste fue el método utilizado para detectar los plásmidos en todas las cepas de N. gonorrhoeae estudiadas.

Efectuamos las electroforesis a 100 V y 50 mA durante 4 horas, utilizando un gel de agarosa al 0'8% en TBE.

El resultado de la detección de plásmidos en las cepas estudiadas se puede apreciar en la tabla VII y en las figuras 6 y 7 se muestran las electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos portados por las cepas de N. gonorrhoeae más representativos del presente estudio. Los pesos moleculares de los mismos se determinaron por extrapolación de la recta de calibrado efectuada en cada experimento, como se describe en el apartado de métodos.

En todas las cepas se detectó la presencia de, al

Tabla VII: Plásmidos de las 116 cepas de N. gonorrhoeae.

Producción de penicilinasas	Plásmidos (P.M.)	Nº de cepas	%
-	2'6 Mda	72	62
-	2'6 y 24'5 Mda	24	20'6
-	2'6 y 7'8 Mda	4	3'4
-	2'6, 7'8 y 24'5 Mda	2	1'8
+	2'6 y 4'5 Mda	2	1'8
+	2'6, 4'5 y 24'5 Mda	10	8'6
+	2'6 y 3'2 Mda	1	0'9
+	2'6, 4'8 y 24'5 Mda	1	0'9
	Sin plásmidos	0	0

Peso molecular (Mda.)

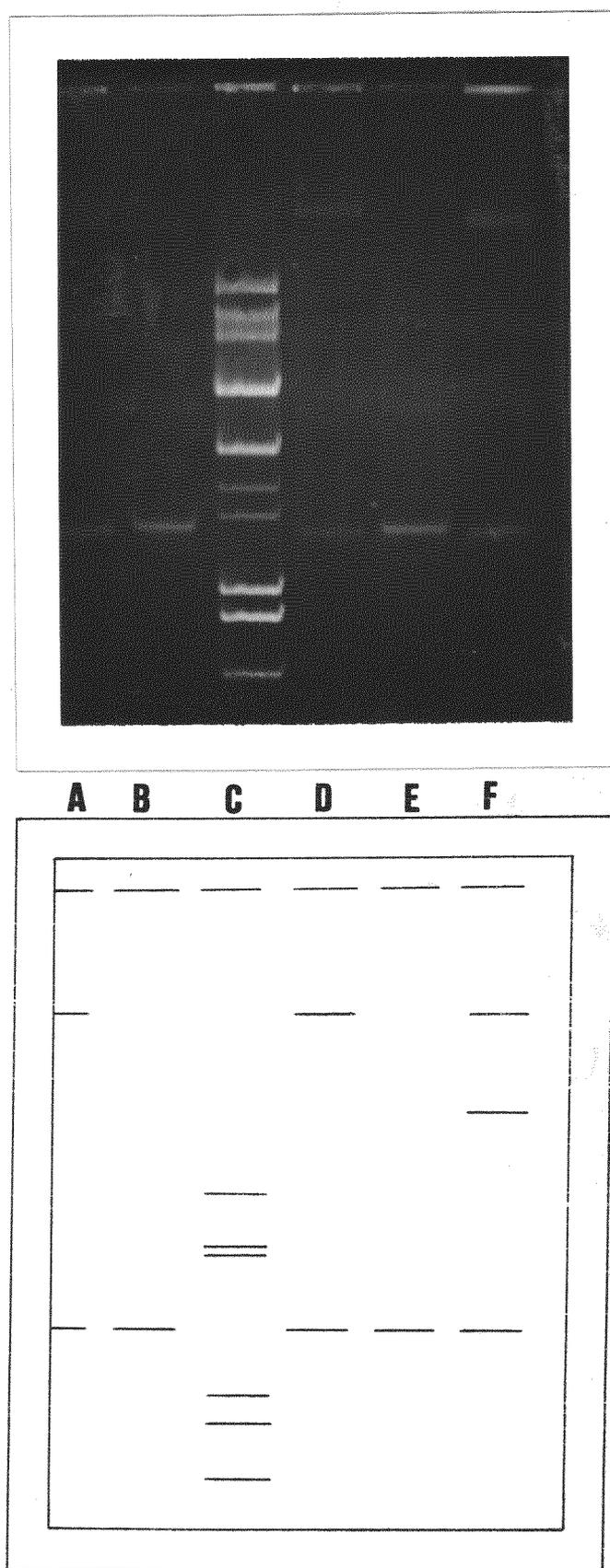


Figura 6.- Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% durante 4 horas a 100 V y 50 mA. A) y D) plásmidos de 2.6 y 24.5 Mda, B) y E) plásmido de 2.6 Mda, C) plásmidos de la cepa patrón de E. coli V517, F) plásmidos de 2.6, 7.8 y 24.5 Mda.

Peso molecular (Mda.)

35'8
4'8
3'7
3'4
2
1'8

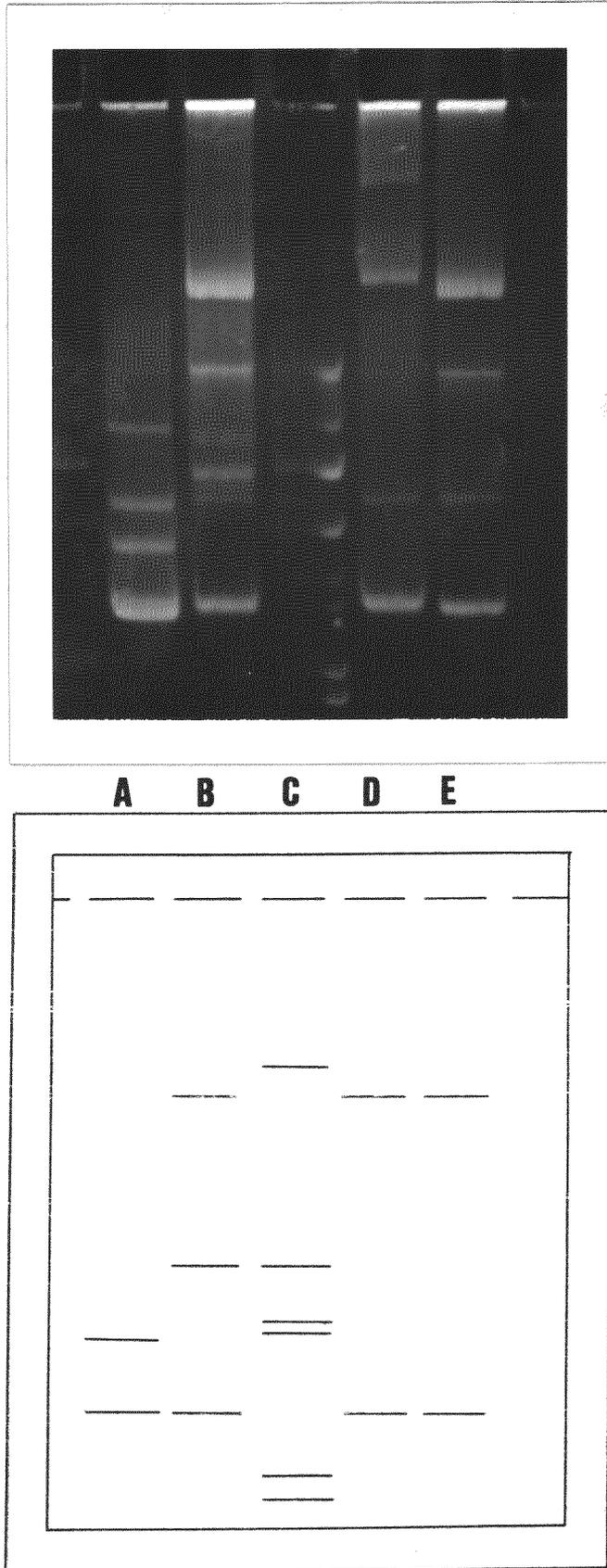


Figura 7.- Electroforesis en gel de agarosa al 0'8% durante 4 horas a 100 V y 50 mA. A) plásmidos de 2'6 y 3'2 Mda, B) plásmidos de 2'6, 4'8 y 24'5 Mda, C) plásmidos de la cepa patrón de E. coli V517, D) y E) plásmidos de 2'6 y 24'5 Mda.

menos, un plásmido. El plásmidos críptico de 2'6 Mda se encontró en todas las cepas; en 72 cepas (62%), éste fue el único plásmido presente.

La combinación del plásmido críptico con el plásmido conjugativo de 24'5 Mda, apareció en 24 cepas (20'6%). en 4 (3'4%), aparecieron los dos plásmidos crípticos de 2'6 y 7'8 Mda; en 2 cepas (1'8%) apareció el mismo patrón anterior más el plásmido de 24'5 Mda.

En las 14 cepas productoras de penicilinas se pudo apreciar una gran variedad de patrones plasmídicos; en 12 cepas (85'7%), el plásmido responsable de la producción del enzima fue el de 4'5 Mda y en todas las cepas, excepto en dos, estuvo acompañado por el plásmido conjugativo. Sólo una cepa productora de penicilinas (7%), presentó el plásmido de 3'2 Mda.

Una de las cepas productoras de penicilinas (la 34/85), llamó la atención porque en ella se detectó un plásmido de un peso molecular de 4'8 Mda que, por ahora, no lo hemos hallado descrito en la literatura.

4.- DETERMINACION DE LOS REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES O AUXOTIPIA

Los auxotipos de las cepas de N. gonorrhoeae estudiadas, así como el fenotipo y su frecuencia se pueden observar en la tabla VIII.

La determinación de los requerimientos nutricionales se consiguió en un 94% de las cepas, ya que hubo 7 cepas que no crecieron en el medio completo NEDA.

El auxotipo más frecuente entre las cepas no productoras de penicilinas fue el 2 o requiriente de Prolina

Tabla VIII: Fenotipos y Auxotipos de las cepas de N. gonorrhoeae no productoras de penicilinasas.

Fenotipo	Auxotipo	Nº de cepas (% del total)
	No crece	7 (6%)
Cero	1	17 (14'6%)
Pro ⁻	2	34 (29'3%)
Arg ⁻	3	1 (0'9%)
Met ⁻	4	1 (0'9%)
Pro ⁻ Hyx ⁻	9	10 (8'6%)
Pro ⁻ Hyx ⁻ V ⁻	10	1 (0'9%)
Pro ⁻ Arg ⁻ Hyx ⁻ Ura ⁻	11	2 (1'7%)
Pro ⁻ Ura ⁻		2 (1'7%)
Pro ⁻ Hyx ⁻ Ura ⁻		3 (2'6%)
Pro ⁻ His ⁻ Hyx ⁻		2 (1'7%)
Hyx ⁻		18 (15'5%)
Hyx ⁻ Ura ⁻		2 (1'7%)
His ⁻		2 (1'7%)

(Pro^-) presentado por 34 cepas (29'3% del total), le siguieron en frecuencia aquellas que necesitaron Hipoxantina (Hyx^-) para su metabolismo - 18 cepas (15'5%) - y las no requirientes o prototrofas que constituyen el auxotipo 1 con 17 cepas (14'6%). Las 33 cepas restantes (28'5%), pertenecieron a 10 auxotipos diferentes.

Entre las cepas productoras de penicilinasas (tabla IX) el auxotipo más común fue el número 2 (Pro^-) al que pertenecieron 11 cepas (9'5%). De las 3 cepas restantes, una fue prototrófica, otra necesitó $\text{Pro}^- \text{Hyx}^- \text{Ura}^-$ y la última $\text{Pro}^- \text{His}^- \text{Hyx}^-$. Este último requerimiento fue el presentado por la única cepa productora del enzima que portaba el plásmido de 3'2 Mda.

5.- DETERMINACION DE LOS SEROGRUPOS Y SEROTIPOS

En la tabla X podemos apreciar el número de cepas de N. gonorrhoeae productoras y no de penicilinasas pertenecientes a los distintos serogrupos: WI y WII/III.

Todas las cepas estudiadas reaccionaron con los antisueros, perteneciendo por lo tanto a uno de los dos grupos descritos (WI o WII/III). Sólo pudimos detectar una cepa dentro del serogrupo WII/III que perteneció al subgrupo WIII.

Tanto en las cepas productoras como no de penicilinasas, el serogrupo más frecuente fue el WII/III.

En la tabla XI se pueden observar los serogrupos, así como los serotipos de las 116 cepas.

Dentro del serogrupo WI, sólo se detectaron 8 serotipos mientras que en el WII/III ascendieron a 23.

Tabla IX: Fenotipos y Auxotipos de las cepas de N. gonorrhoeae productoras de penicilinasas.

Fenotipo	Auxotipo	Nº de cepas (% del total)
Cero	1	1 (0'9%)
Pro ⁻	2	11 (9'5%)
Pro ⁻ Hyx ⁻ Ura ⁻		1 (0'9%)
Pro ⁻ His ⁻ Hyx ⁻		1 (0'9%)

Tabla X: Número de cepas de N. gonorrhoeae productoras y no de penicilinasas de los dos serogrupos: WI y WII/III incluídas en este estudio.

=====

Nº de cepas de los distintos serogrupos

=====

Aislamientos	WI (%)	WII/III (%)	Nº total
Cepas no productoras de penicilinasas	32 (31'4)	70 (68'8)*	102 (88)
Cepas productoras de penicilinasas	2 (14'3)	12 (85'7)	14 (12)
Total	34 (29'3)	82 (70'7)	116 (100)

* Una de las cepas aquí incluídas perteneció al subgrupo WIII.

Entre las cepas pertenecientes al serogrupo WI, el serotipo más común fue el Aedih/Arst y en el WII/III: Bajk/Bropt, Back/Bropyt y Bak/Bropyt.

Con los reactivos del sistema GS se detectaron 7 serotipos dentro del serogrupo WI y 4 con los anticuerpos del sistema Ph. Dos serotipos determinados por el sistema Ph se correspondieron en cada caso con dos serotipos diferentes determinados por el sistema GS; un serotipo establecido con los anticuerpos Ph se correspondió con tres distintos del sistema GS y el serotipo restante, se correspondió únicamente con otro del sistema GS.

En lo referente al serogrupo WII/III se pudieron observar 15 serotipos con el sistema GS y 14 con el Ph. Tan sólo en 7 cepas, la correspondencia de serotipos determinados por ambos sistemas fue 1:1. Con el sistema de anticuerpos Ph se observó que el serotipo Bropyt, al que pertenecieron 26 cepas, tuvo su correspondencia con 4 serotipos del sistema GS. El serotipo Bopyst que incluyó 8 cepas, tuvo su equivalente en 3 serotipos diferentes del otro sistema. Para finalizar, los serotipos Bruyt, Bropt, Brpyst y Broypst, tuvieron en cada caso su correspondencia en dos diferentes serotipos del sistema GS.

La única cepa que perteneció al subgrupo WIII fue la que presentó el serotipo Beghjk.

Como puede observarse en la tabla XII, de las 14 cepas productoras de penicilinas, 12 pertenecieron al serogrupo WII/III, correspondiendo a un 85.7% y de éstas, 6 (50%), presentaron el serotipo Back/Bropyt, 2 (16%), el serotipo Bak/Broyt y 1 (8.3%), la variedad Bak/Bropyt 2 cepas (14.3%) fueron del serotipo Bcegjk/Bpyust y 1 fue del serotipo Bacejk/Brpyust.

Tabla XII: Relación entre Plásmidos/Fenotipo/Serogrupo/Serotipo de las cepas productoras de penicilinas y de 3 cepas con resistencia cromosómica a Penicilina.

Nº de la cepa	Plásmidos	Fenotipo	Serogrupo	Serotipo GS	Serotipo Ph
21/85	2'6, 4'5, 24'5 Mda	Pro ⁻	WII/III	Back	Bropyt
26/85	2'6, 4'5, 24'5 Mda	Pro ⁻	WII/III	Bcegjk	Bpyust
29/85	2'6, 4'5, 24'5 Mda	Pro ⁻	WII/III	Back	Bropyt
30/85	2'6, 4'5, 24'5 Mda	Pro ⁻	WII/III	Bcegjk	Bpyust
34/85	2'6, 4'8, 24'5 Mda	Pro ⁻ Hyx ⁻ Ura ⁻	WII/III	Back	Bropyt
46/85	2'6, 4'5 Mda	No requiriente	WI	Aedgkih	Arost
49/85	2'6, 4'5 Mda	Pro ⁻	WII/III	Bacejk	Brpyust
57/85	2'6, 4'5, 24'5 Mda	Pro ⁻	WII/III	Back	Bropyt
3/86	2'6, 4'5, 24'5 Mda	Pro ⁻	WII/III	Bak	Bropyt
11/86	2'6, 3'2 Mda	Pro ⁻ His ⁻ Hyx ⁻	WI	Aedih	Arst
19/86	2'6, 4'5, 24'5 Mda	Pro ⁻	WII/III	Back	Bropyt
21/86	2'6, 4'5, 24'5 Mda	Pro ⁻	WII/III	Back	Bropyt
41/86	2'6, 4'5, 24'5 Mda	Pro ⁻	WII/III	Bak	Broyt
43/86	2'6, 4'5, 24'5 Mda	Pro ⁻	WII/III	Bak	Broyt
22/86		Pro ⁻	WII/III	Bajk	Bropyt
61/86		Hyx ⁻	WII/III	Bajk	Bopyt
66/86		Pro ⁻	WI	Adih	Arst

Entre la población de cepas no productoras de penicilinas, el serotipo más frecuente fue el Bropyt determinado por el sistema Ph de anticuerpos monoclonales y se correlacionó con 4 distintos serotipos determinados por el sistema GS. El denominador común de estos cuatro serotipos fue la aglutinación con los anticuerpos llamados " a " y " k ".

6.- RELACION PLASMIDOS/SENSIBILIDAD

El análisis de las posibles relaciones entre plásmidos y sensibilidad demuestra que, en lo concerniente a las cepas no productoras de penicilinas, no existe relación alguna puesto que ninguna de estas cepas portaba plásmidos R y este hecho se vió reflejado en los valores de CMI_{50} y CMI_{90} para los distintos agentes antimicrobianos (tabla VI). No ocurre lo mismo cuando se analizan las cepas productoras del enzima, ya que, y como se puede observar en la tabla XIII, los valores de CMI de Penicilina se vieron incrementados en relación a lo acontecido con las cepas no productoras (tabla VI). También los valores de CMI de Tetraciclina se vieron ligeramente incrementados en las cepas productoras de penicilinas en relación a la otra población.

7.- RELACION PLASMIDOS/AUXOTIPIA

Entre las cepas productoras de penicilinas parece existir una correlación significativa entre el plásmido de 4'5 Mda y los requerimientos nutricionales de Prolina ya que, de las 13 cepas que portaron el plásmido de 4'5 Mda, todas excepto una, que fue prototrófica, requirieron Prolina, sólo o acompañada de otro aminoácido (tabla XII).

Hemos encontrado una diferencia estadísticamente

Tabla XIII: Relación entre los plásmidos de las cepas de N. gonorrhoeae productoras de penicilinasa y sus sensibilidades a Penicilina y Tetraciclina.

Nº de la cepa	Plásmidos	C.M.I. (ug/ml)	
		Penicilina	Tetraciclina
21/85	2'6, 4'5, 24'5 Mda	8	2
26/85	2'6, 4'5, 24'5 Mda	4	8
29/85	2'6, 4'5, 24'5 Mda	8	2
30/85	2'6, 4'5, 24'5 Mda	4	8
34/85	2'6, 4'8, 24'5 Mda	8	2
46/85	2'6, 24'5 Mda	4	4
49/85	2'6, 24'5 Mda	8	4
57/85	2'6, 4'5, 24'5 Mda	16	2
3/86	2'6, 4'5, 24'5 Mda	8	8
11/86	2'6, 3'2 Mda	4	2
19/86	2'6, 4'5, 24'5 Mda	4	4
21/86	2'6, 4'5, 24'5 Mda	4	4
41/86	2'6, 4'5, 24'5 Mda	8	4
43/86	2'6, 4'5, 24'5 Mda	8	2

significativa ($p = 0'0096$) entre la presencia del plásmido de 24'5 Mda y las necesidades de Prolina y de esta forma, del total de cepas portadoras de este plásmido que fueron 37, 17 cepas (46%) necesitaron sólo y exclusivamente Prolina, 12 cepas (32'4%) requirieron el aminoácido anterior junto con otros, y de las 8 cepas restantes (21'6%) 4 requirieron Hipoxantina y las otras 4 fueron prototróficas.

No se encontró ninguna otra relación entre plásmidos y requerimientos nutricionales.

8.- RELACION PLASMIDOS/SEROGRUPO

Como puede observarse en la tabla XII, todas las cepas productoras de penicilinas portadoras del plásmido de 4'5 Mda, a excepción de una, pertenecieron al serogrupo WII/III, mientras que la única cepa productora del enzima que albergó el plásmido de 3'2 Mda se incluyó en el serogrupo WI. De ello podemos inferir la relación entre el plásmido de 4'5 Mda y el serogrupo WII/III.

No se hallaron otras relaciones entre otros plásmidos y el serogrupo al que pertenecieron las cepas que los portaban.

9.- RELACION SENSIBILIDAD/AUXOTIPIA

En el presente estudio se ha podido observar que los requerimientos de Prolina en las cepas de N. gonorrhoeae se han asociado a altos niveles de resistencia a Penicilina (CMI mayor de 0'5 ug/ml) ($p = 0'0035$). Asimismo hubo una asociación entre Pro^- y valores mayores de CMI de Tetraciclina (CMI mayor de 2 ug/ml) ($p = 0'05$).

Otras relaciones significativas encontradas han si-

do, la del requerimiento de Hipoxantina con cepas muy sensibles a Penicilina (CMI menor de 0'05 ug/ml) ($p=0'013$), Tetraciclina (CMI menor de 2 ug/ml) ($p = 0'026$) y Ceftriaxona (CMI menor de 0'0037 ug/ml) ($p = 0'018$).

Del mismo modo al punto anterior, las cepas prototróficas se relacionaron con niveles de mayor sensibilidad a Penicilina (CMI menor de 0'05 ug/ml) ($p = 0'04$) y en un sentido opuesto, a menor sensibilidad a Ofloxacina (CMI mayor de 0'03 ug/ml) ($p = 0'0052$).

Para finalizar, se ha podido observar una diferencia significativa ($p = 0'037$) entre cepas que no crecieron en el medio completo NEDA y valores de CMI mayores de Eritromicina de 0'06 ug/ml.

10.- RELACION SENSIBILIDAD/SEROGRUPO

En la tabla XIV podemos observar cómo se inhibió el crecimiento de las 116 cepas de N. gonorrhoeae de los distintos serogrupos con los agentes antimicrobianos estudiados.

Sólo hemos encontrado asociación significativa entre cepas más sensibles a Penicilina (CMI menor de 0'05 ug/ml) y a Ceftriaxona (CMI menor de 0'0018 ug/ml) y el serogrupo WI, presentando un valor de $p = 0'0014$ y 0'047 respectivamente.

11.- RELACION AUXOTIPIA/SEROGRUPO

Esta comparación se puede observar en la tabla XV y en la Figura 8.

Estadísticamente, hubo una diferencia significativa ($p = 0'024$) entre cepas que requirieron Hipoxantina y

Tabla XIV: Relación Sensibilidad/Serogrupo

Porcentajes acumulativos de cepas inhibidas a distintas concentraciones de antimicrob.

Antimicrobiano	Concentraciones (ug/ml)															
	0'00045	0'0009	0'0018	0'0037	0'0075	0'015	0'03	0'06	0'12	0'25	0'5	1	2	4	8	16
PENICILINA																
WI						9	38	71	91	91	91	91	94	100		
WII/III						6	12	55	78	83	85	85	85	90	99	100
TETRACICLINA																
WI												6	68	97	100	
WII/III										1	4	50	90	96	100	
ESPECTINOMICINA																
WI																35 100
WII/III																21 100
ERITROMICINA																
WI						3	26	85	100							
WII/III						5	20	76	95	100						
CEFTRIAXONA																
WI			9	62	100											
WII/III	1	10	41	90	100											
CIPROFLOXACINA																
WI			44	76	97	100										
WII/III			23	61	92	95	95	100								
OFLOXACINA																
WI							53	94	97	100						
WII/III						2	45	95	95	98	100					

Tabla XV: Relación de los Fenotipos con los Serogrupos de las 116 cepas de N. gonorrhoeae.

Tipo de cepas	Fenotipo	WI Nº de cepas (%)	WII/III Nº de cepas (%)	Total
NGPP	Pro ⁻	0	11 (9'4)	11
	Pro ⁻ Hyx ⁻ Ura ⁻	0	1 (0'8)	1
	Pro ⁻ His ⁻ Hyx ⁻	1 (0'8)	0	1
	Prototrófica	1 (0'8)	0	1.
NGNPP	Pro ⁻	11 (9'4)	23 (19'8)	34
	Hyx ⁻	5 (4'3)	13 (11'1)	18
	His ⁻	0	2 (1'7)	2
	Arg ⁻	0	1 (0'8)	1
	Met ⁻	1 (0'8)	0	1
	Pro ⁻ Ura ⁻	0	2 (1'7)	2
	Hyx ⁻ Ura ⁻	0	2 (1'7)	2
	Pro ⁻ Hyx ⁻	6 (5'2)	4* (3'4)	10
	Pro ⁻ Hyx ⁻ Ura ⁻	2 (1'7)	1 (0'8)	3
	Pro ⁻ Hyx ⁻ V ⁻	1 (0'8)	0	1
	Pro ⁻ His ⁻ Hyx ⁻	0	2 (1'7)	2
	Pro ⁻ Arg ⁻ Hyx ⁻ Ura ⁻	2 (1'7)	0	2
	Prototróficas	2 (1'7)	15 (12'8)	17
No crece	2 (1'7)	5 (4'3)	7	

* Aquí se incluye la única cepa perteneciente al subgrupo WIII.

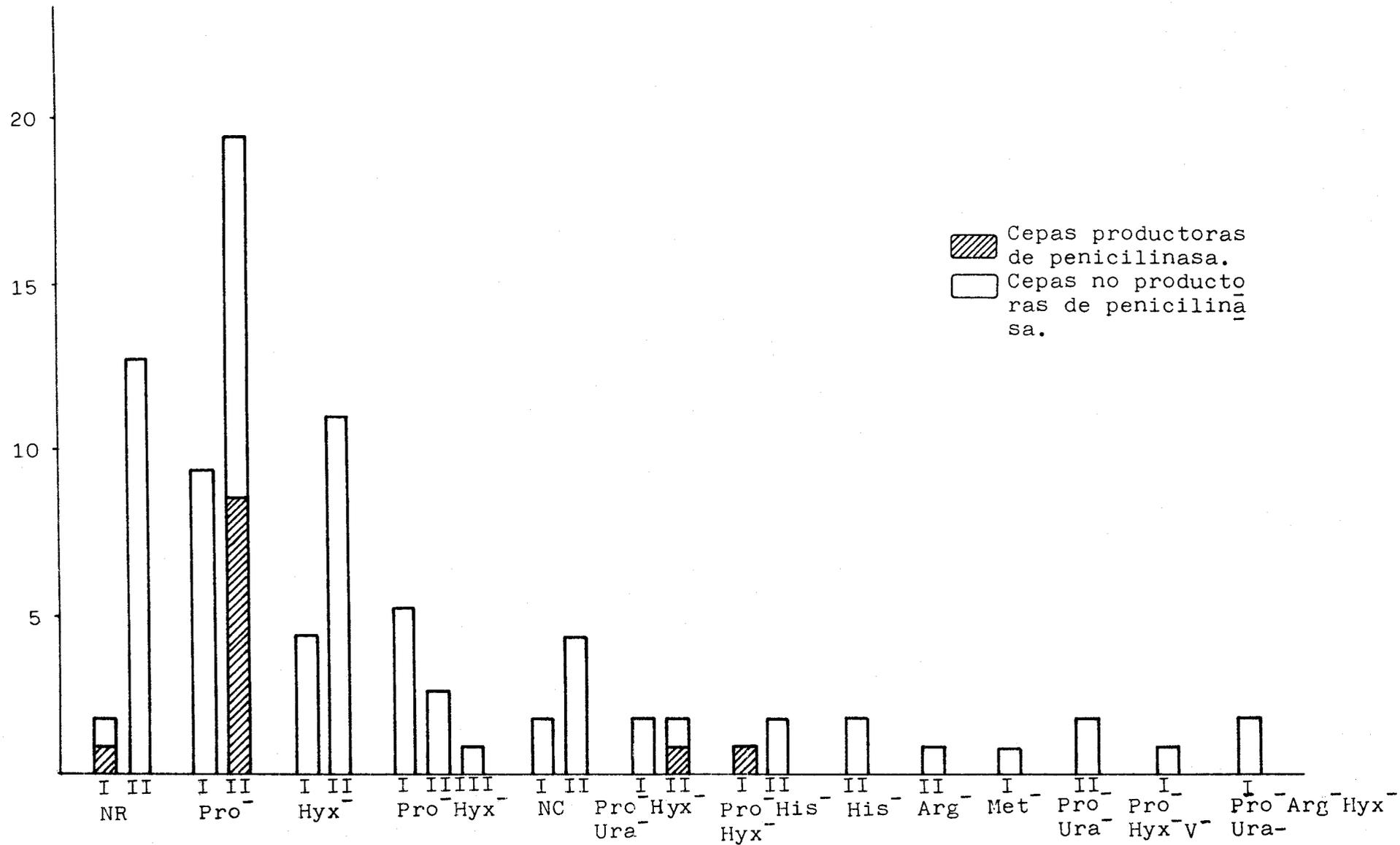


Figura 8.- Relación Fenotipo/Serogrupo de las 116 cepas de N. gonorrhoeae.

y aquellas pertenecientes al serogrupo WI y también entre estas últimas cepas y las que requirieron Prolina e Hipoxantina.

12.- RELACION SENSIBILIDAD/SEXO/PREFERENCIA SEXUAL

Esta relación podemos observarla en la tabla XVI y en las Figuras 9, 10 y 11 que representan las diferentes sensibilidades a Penicilina, Tetraciclina y Eritromicina de las cepas aisladas de varones heterosexuales, homosexuales y mujeres. Únicamente se ha podido observar que las cepas de N. gonorrhoeae no productoras de penicilinas de varones homosexuales, fueron ligeramente menos sensibles a Penicilina que la de los varones heterosexuales y las de las mujeres (exceptuando de esta última población una cepa que fue cromosómicamente resistente y que presentó un CMI de Penicilina de 2 ug/ml); no obstante, esta relación no fue estadísticamente significativa.

13.- RELACION PLASMIDOS/SEXO/PREFERENCIA SEXUAL

No hemos encontrado relaciones significativas en esta comparación.

14.- RELACION AUXOTIPIA/SEXO/PREFERENCIA SEXUAL

Sólo pudimos demostrar que hubo una relación significativa ($p = 0.028$) entre las cepas prototróficas y su procedencia de varones homosexuales cuando se comparó con la población de varones heterosexuales.

15.- RELACION SEROGRUPO/SEXO/PREFERENCIA SEXUAL

Podemos observar dicha relación en la tabla XVII. Como puede apreciarse, la distribución de los dos serogrupos: WI y WII/III en varones heterosexuales y mujeres fue

Tabla XVI: Porcentajes acumulativos de las CMI's de Penicilina, Tetraciclina y Eritromicina de las cepas de N. gonorrhoeae según el grupo de población en que se aislaron.

Antibiótico	Población	Concentraciones (ug/ml)								
		0'015	0'03	0'06	0'12	0'25	0'5	1	2	4
PENICILINA	VARON HOMOSEX.	13	13	20	87	87	100			
	VARON HETEROSEX.	9	22	72	96	100				
	MUJER	3	27	91	97	97	97	97	100	
TETRACICLINA	VARON HOMOSEX.							67	100	
	VARON HETEROSEX.						2	59	98	100
	MUJER					3	12	67	100	
ERITROMICINA	VARON HOMOSEX.		27	80	100					
	VARON HETEROSEX.	6	22	76	94	100				
	MUJER	6	24	82	100					

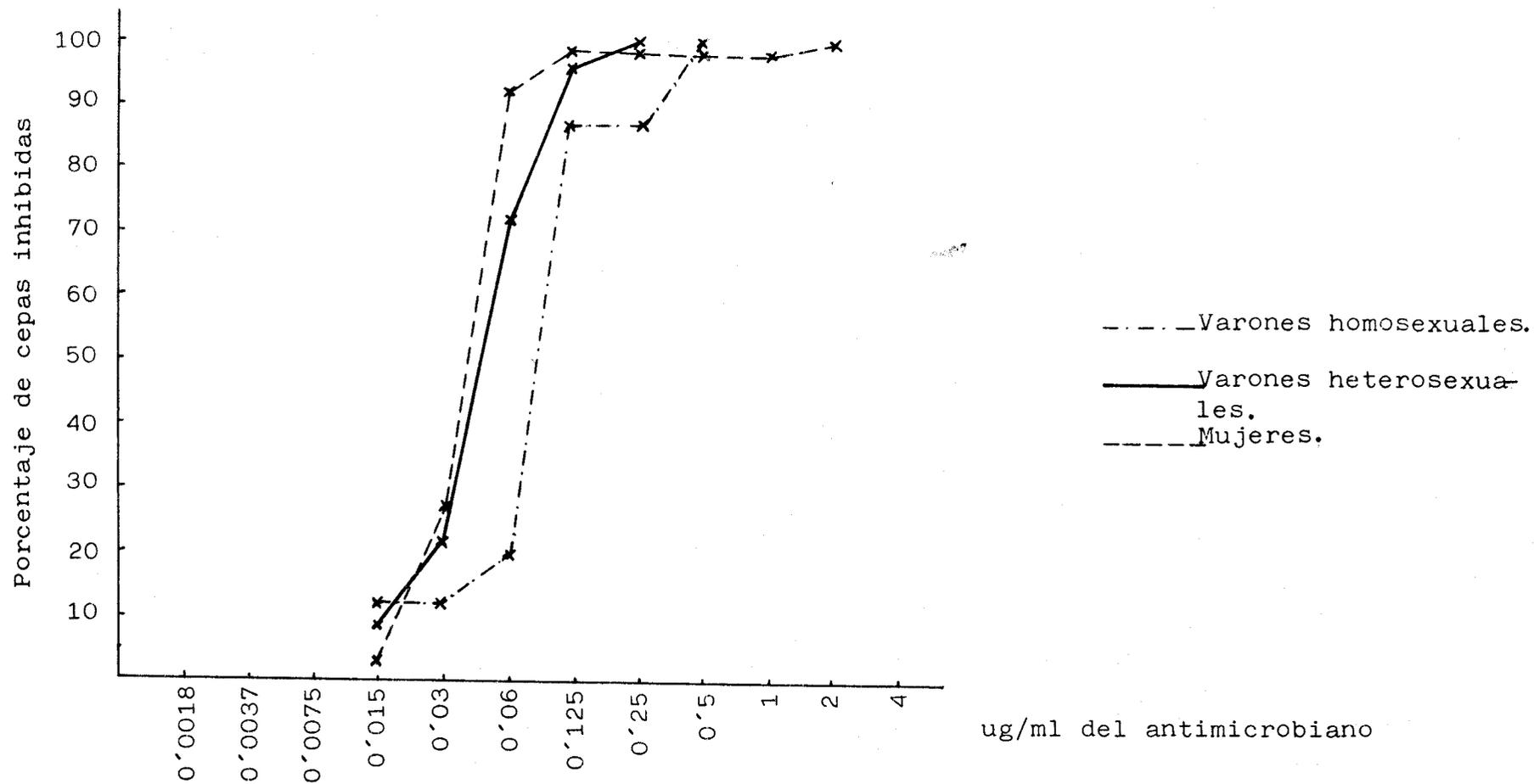


Figura 9.- Actividad " in vitro " de Penicilina sobre cepas de N. gonorrhoeae no productoras de penicilinas procedentes de los tres grupos de poblaciones.

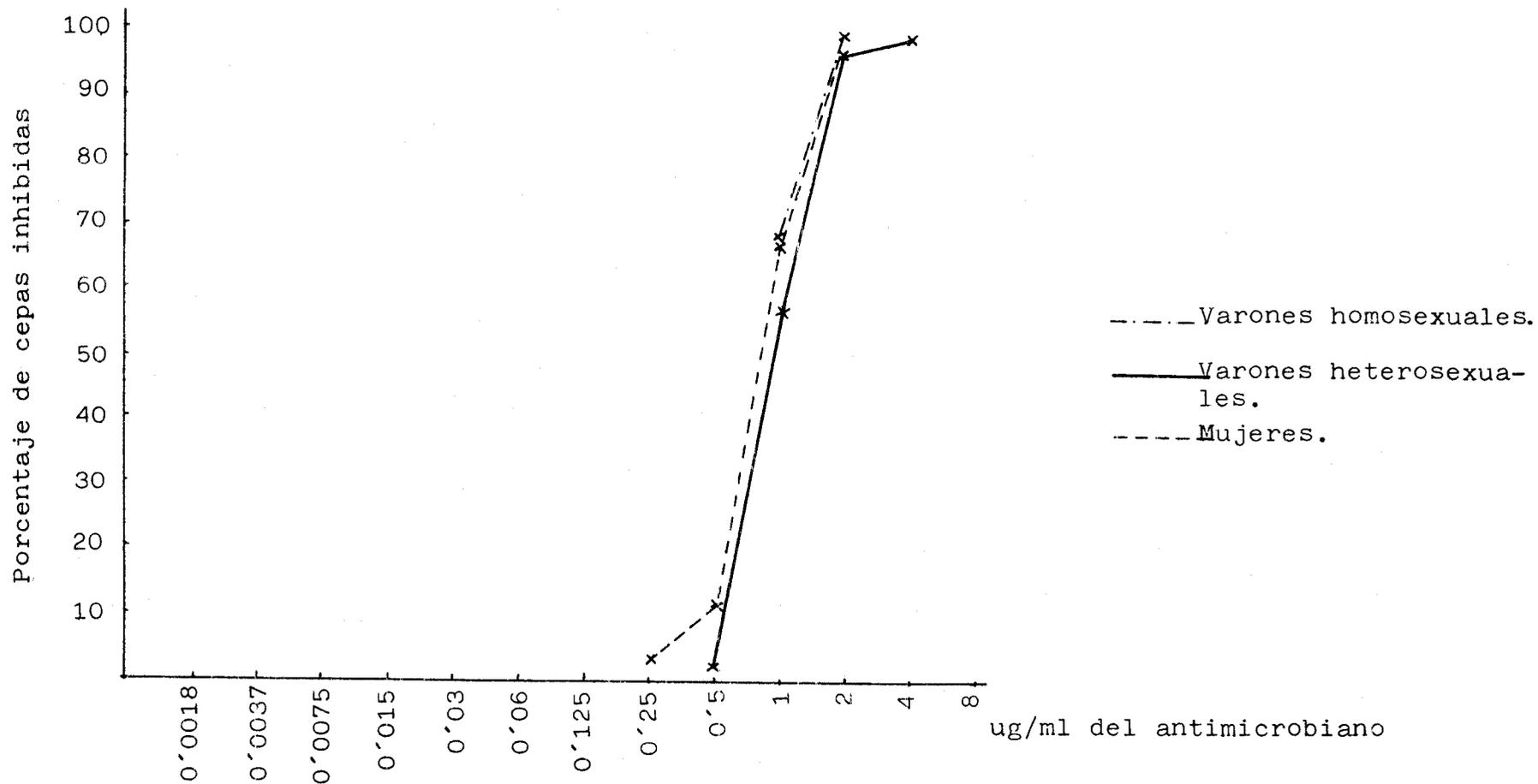


Figura 10.- Actividad " in vitro " de Tetraciclina sobre cepas de N. gonorrhoeae no productoras de penicilinas procedente de los tres grupos de poblaciones.

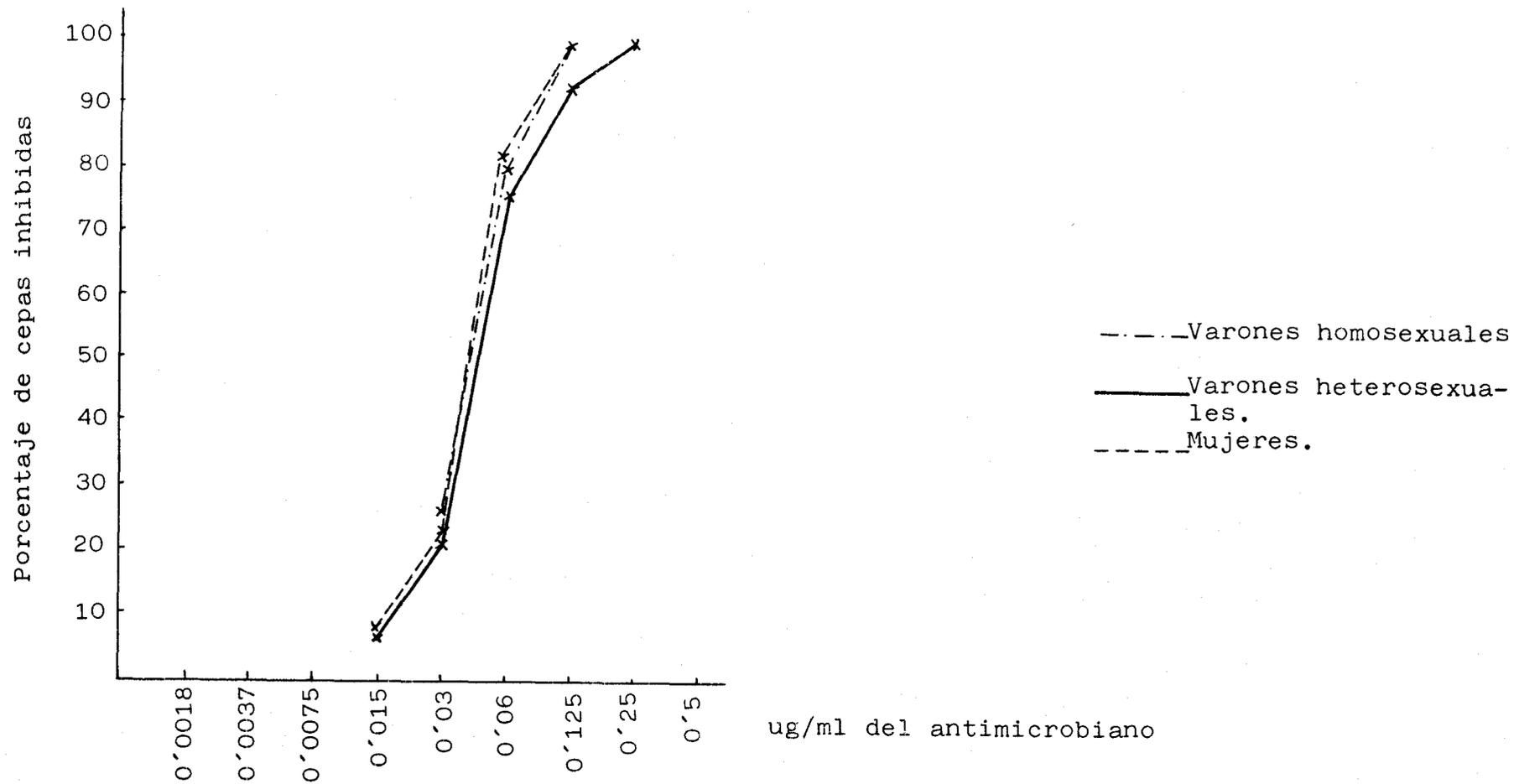


Figura 11.- Actividad " in vitro " de Eritromicina sobre cepas de N. gonorrhoeae no productoras de penicilinas procedentes de los tres grupos de poblaciones.

Tabla XVII: Distribución de los serogrupos WI y WII/III de N. gonorrhoeae según el grupo de población.

Sexo/Preferencia sexual	Número de cepas (%)		
	WI	WII/III	Total
Varón heterosexual	21 (32'3)	44 (67'7)	65 (100)
Varón homosexual	1 (6'7)	14 (93'3)	15 (100)
Mujer	12 (33'3)	24 (66'6)	36 (100)

semejante. Sin embargo pudimos detectar una asociación significativa con $p = 0'04$ entre las cepas del serogrupo WII/III y la población de varones homosexuales cuando se comparó con la población de varones heterosexuales y con la de mujeres.

16.- SEGUIMIENTO DE CONTACTOS MEDIANTE DETERMINACION DE PLASMIDOS, AUXOTIPIA Y SEROTIPIA

En la tabla XVIII exponemos los datos de las cepas entre los que podemos encontrar alguna relación, bien por pertenecer a los miembros de una pareja o por haberse aislado de un mismo paciente en ocasiones distintas.

Como puede observarse, las cepas aisladas de los componentes de una pareja coincidieron en todos los parámetros a excepción de las numeradas como 25/85 - 31/85 en las que, salvo el serotipo, todas las demás características fueron diferentes y las numeradas como 2/86 - 4/86, 69/86 - 74/86 y 75/86 - 76/86 que presentaron el mismo auxotipo y serotipo pero no coincidieron en los plásmidos detectados ya que, en una de las dos cepas, se observó el plásmido conjugativo junto con el de 2'6 Mda y en la otra cepa, sólo este último plásmido.

Los parámetros epidemiológicos de las cepas aisladas en diferentes ocasiones de un mismo paciente (generalmente aisladas en un intervalo de 7 días, cuando acudieron a la visita de control), coincidieron en la mayoría de los casos, a excepción de lo ocurrido con las parejas de cepas: 30/85 - 33/85 (una productora y la otra no productora de penicilinasa), la 46/85 - 49/85 (ambas productoras del enzima) y la 30/86 - 32/86 (ambas no productoras de penicilinasa).

En la tabla XIX podemos observar la relación de ce-

Tabla XVIII: Aplicación de la determinación de Plásmidos/Auxotipo/Serotipos para el seguimiento de contactos.

I.- Cepas que se aislaron de los dos componentes de una pareja

		Cepas N°	Plásmidos	Fenotipo/Auxotipo	Serotipo (GS/Ph)
Pareja 1	Varon heterosex.	25/85	2'6,7'8,24'5	Pro ⁻ Ura ⁻	Bac/Bropyt
	Mujer heterosex.	31/85	2'6	Pro ⁻ /2	
Pareja 2	Varon heterosex.	26/85	2'6,4'5,24'5	Pro ⁻ /2	Bcegjk/Bpyust
	Mujer heterosex.	30/85			
Pareja 3	Varon heterosex.	2/86	2'6	Pro ⁻ /2	Bacejk/Brpyust
	Mujer heterosex.	4/86	2'6,24'5		
Pareja 4	Varon homosex.	15/86	2'6,24'5	Protótrofa/1	Bacgk/Bopyst
	Varon homosex.	17/86			
Pareja 5	Varon heterosex.	19/86	2'6,4'5,24'5	Pro ⁻ /2	Bac/Bropyt
	Mujer heterosex.	21/86			
Pareja 6	Varon heterosex.	25/86	2'6	Pro ⁻ /2	Bak/Bropyt
	Mujer heterosex.	24/86			

Tabla XVIII: (Continuación).

	Cepas Nº	Plásmidos	Fenotipo/Auxotipo	Serotipo (GS/Ph)
Pareja 7	Varon heterosex. 43/86	2'6,4'5,24'5	Pro ⁻ /2	Bak/Broyt
	Mujer heterosex. 41/86			
Pareja 8	Varon heterosex. 42/86	2'6	Hyx ⁻	Bajk/Bropyt
	Mujer heterosex. 51/86			
Pareja 9	Varon heterosex. 55/86	2'6	Protótrofa/1	Bajk/Bropt
	Mujer heterosex. 58,59,60/86			
Pareja 10	Varon heterosex. 57/86	2'6	Pro ⁻ /2	Bacej/Butx
	Mujer heterosex. 56/86			
Pareja 11	Varon heterosex. 69/86	2'6,24'5	Pro ⁻ /2	Adgkih/Arost
	Mujer heterosex. 74/86			
Pareja 12	Varon heterosex. 76/86	2'6,24'5	Pro ⁻ His ⁻ Hyx ⁻	Bacgjk/Brput
	Mujer heterosex. 75/86			
Pareja 13	Varon heterosex. 77/86	2'6	Pro ⁻ /2	Back/Bropyt
	Mujer heterosex. 81/86			

Tabla XVIII: (Continuación).

II.- Cepas que se aislaron de un mismo paciente en diferentes ocasiones

	Cepas Nº	Plásmidos	Fenotipo/Auxotipo	Serotipo (GS/Ph)
Paciente 1: Varon heterosex.	21/85 29/85	2'6,4'5,24'5	Pro ⁻ /2	Back/Brpyt
Paciente 2: Mujer heterosex.	30/85 33/85	2'6,4'5,24'5 2'6	Pro ⁻ /2 Hyx ⁻ Ura ⁻	Bcegjk/Bpyust Bacejk/Brpyust
Paciente 3: Varon heterosex.	46/85 49/85	2'6,4'5	Protótrofa/1 Pro ⁻ /2	Aedgkih/Arost Bacejk/Brpyust
Paciente 4: Mujer heterosex.	4/86 6/86	2'6	Pro ⁻ /2	Bacejk/Brpyut
Paciente 5: Mujer heterosex.	30/86 32/86	2'6 2'6,24'5	Hyx ⁻ Pro ⁻ /2	Bagjk/Bropyst Aedih/Arst
Paciente 6: Varon homosex.	33/86 38/86	2'6	Protótrofa/1	Bagk/Bopys
Paciente 7: Varon heterosex.	42/86 52/86	2'6	Hyx ⁻	Bajk/Brpyt

Tabla XIX: Posibles contactos no verificados por la historia clínica.

	Cepas Nº	Plásmidos	Fenotipo/Auxotipo	Serotipo (GS/Ph)
Pareja 1	Varon heterosex. 47/85	2'6	No crece	Bacejk/Brpyust
	Varon homosexual 48/85			
Pareja 2	Mujer heterosex. 50/85	2'6	Pro ⁻ Hyx ⁻ Ura ⁻	Aedih/Arst
	Varon heterosex. 51/85			
Pareja 3	Varon heterosex. 18/86	2'6	Pro ⁻ /2	Aedih/Arst
	Mujer heterosex. 20/86			
Pareja 4	Varon heterosex. 28/86	2'6	Pro ⁻ Arg ⁻ Hyx ⁻ Ura ⁻ /11	Afd/Arsv
	Mujer heterosex. 29/86			
Pareja 5	Varon heterosex. 35/86	2'6	Hyx ⁻	Aedih/Arst
	Mujer heterosex. 36/86			
Pareja 6	Varon homosex. 61/86	2'6,24'5	Hyx ⁻	Bajk/Bopyt
	Varon homosex. 62/86			
Pareja 7	Varon heterosex. 64/86	2'6	Pro ⁻ /2	Back/Bropyst
	Varon heterosex. 65/86			
Pareja 8	Varon heterosex. 72/86	2'6	Pro ⁻ Hyx ⁻	Af/Ars
	Varon heterosex. 73/86			

pas que pertenecieron a pacientes posiblemente relacionados entre si aunque este dato no figuraba en la historia clínica.

17.- ESTUDIO GENETICO DE LA CEPA 34/85

En la tabla XX podemos observar las características de la cepa de N. gonorrhoeae 34/85 que fue motivo de estudio genético, debido a la detección en ella de un plásmido cuyo peso molecular (4'8 Mda) fue distinto a los hasta ahora publicados en la literatura.

Existen en la literatura descritos numerosos plásmidos responsables de la producción de penicilinasa cuyos pesos moleculares son de 4'5, 4, 3'2, 3 y 2'9 Mda.

Dado el diferente tamaño del plásmido detectado en la cepa 34/85 con los descritos y la resistencia presentada por la cepa a Trimetoprim, nos planteamos el estudio a nivel genético del plásmido con la finalidad de poder establecer si se trata de un plásmido nuevo o no en la especie en estudio.

Para intentar resolver estas preguntas procedimos a realizar los siguientes puntos:

Aislamos y purificamos el plásmido por el método descrito por Cornelis y cols. detallado en el apartado de métodos y posteriormente completamos la purificación por medio de ultracentrifugación en gradiente de densidad de Cloruro de cesio, cuyo resultado se muestra en la Figura 12. Sometimos el ADN a electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%, aplicando una corriente eléctrica de 70 V y 40 mA durante el tiempo que se requirió para que el frente de colorante llegase al final de la superficie del gel.

Tabla XX: Características de la cepa de N. gonorrhoeae 34/85.

Agente antimicrobiano	CMI (ug/ml)	Plásmidos (Mda.)	Fenotipo	Serogrupo	Serotipo (GS/Ph)
PENICILINA	8				
TETRACICLINA	2				
ESPECTINOMICINA	16				
ERITROMICINA	0'06	2'6,4'8,24'5	Pro ⁻ Hyx ⁻ Ura ⁻	WII/III	Back/Bropyt
CEFTRIAXONA	0'0075				
CIPROFLOXACINA	0'0018				
OFLOXACINA	0'015				
TRIMETOPRIM	8				

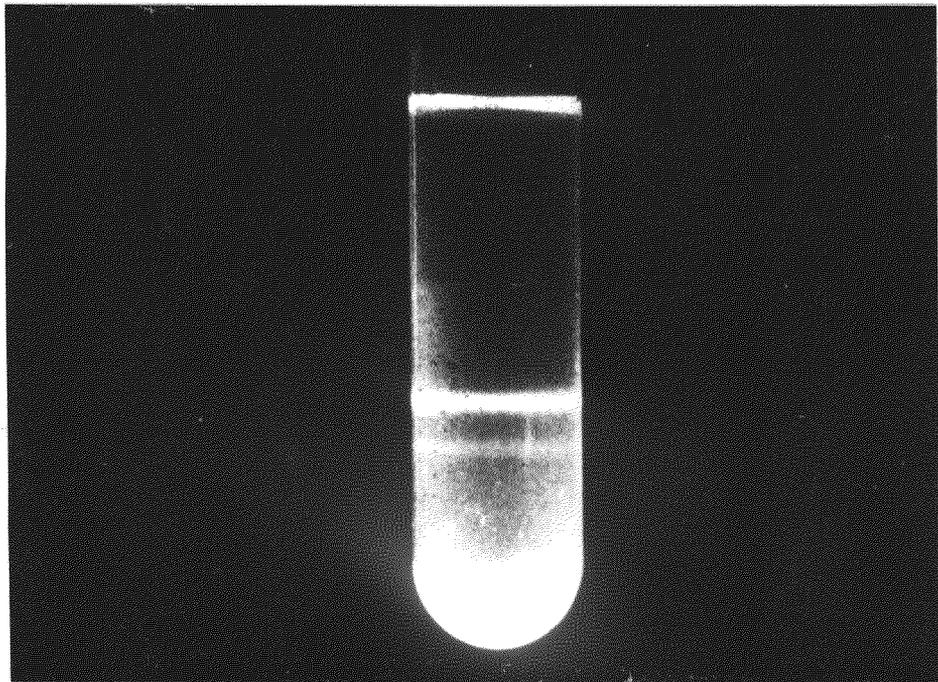


Figura 12.- Gradiente de densidad en Cloruro de cesio de N. gonorrhoeae 34/85. C) banda correspondiente al ADN cromosómico y P) banda correspondiente al ADN plasmídico. Las bandas se visualizaron mediante iluminación con luz ultravioleta.

Una vez extraído el plásmido de 4'8 Mda del gel de agarosa por el método de electroelución mediante electroforesis vertical, lo sometimos a la acción de los enzimas de restricción: Bam HI, Hinc II y Hind III. Bam HI produce dos cortes en el plásmido de 4'5 Mda de N. gonorrhoeae, dando dos fragmentos de 1'45 Mda (2'4 Kb) y otro de 3'04 Mda (5 Kb). Hind III provoca un sólo corte al igual que Hinc II en este mismo plásmido, como puede apreciarse en la Figura 13.

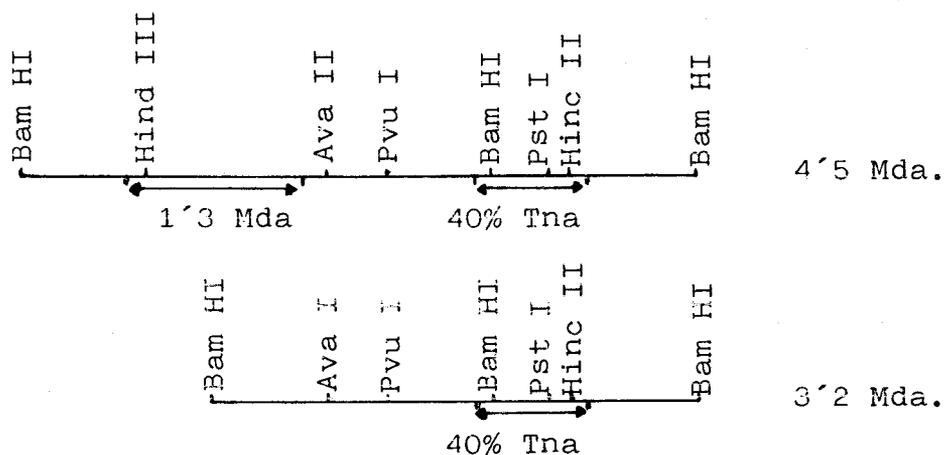


Figura 13.- Puntos donde actúan los enzimas de restricción en los plásmidos R de 4'5 y 3'2 Mda de N. gonorrhoeae.

En la figura 14 mostramos el resultado de la acción de los enzimas de restricción sobre el plásmido de 4'8 Mda de N. gonorrhoeae. Como puede apreciarse, el plásmido de 4'8 Mda fue cortado con Bam HI dando dos fragmentos de 1'45 (2'4 Kb) y 3'35 Mda (5'4 Kb) de peso molecular. No obtuvimos nada más que una banda con los otros dos enzimas, un poco más arriba del lugar donde se encuentra la banda correspondiente a la digestión con estos enzimas del plásmido de 4'5 Mda.

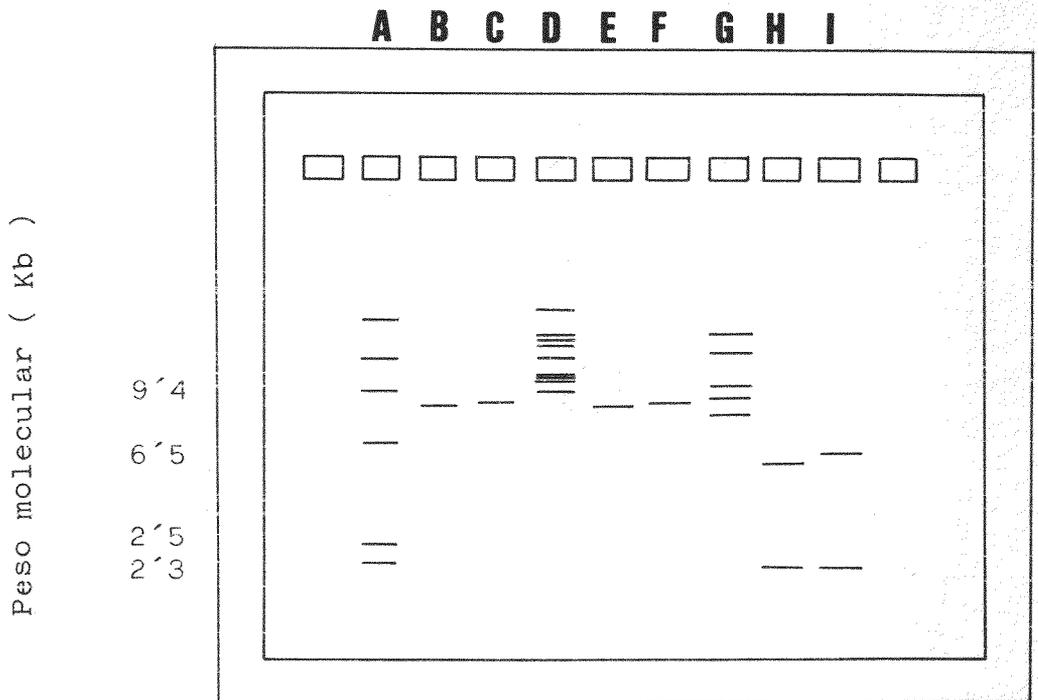
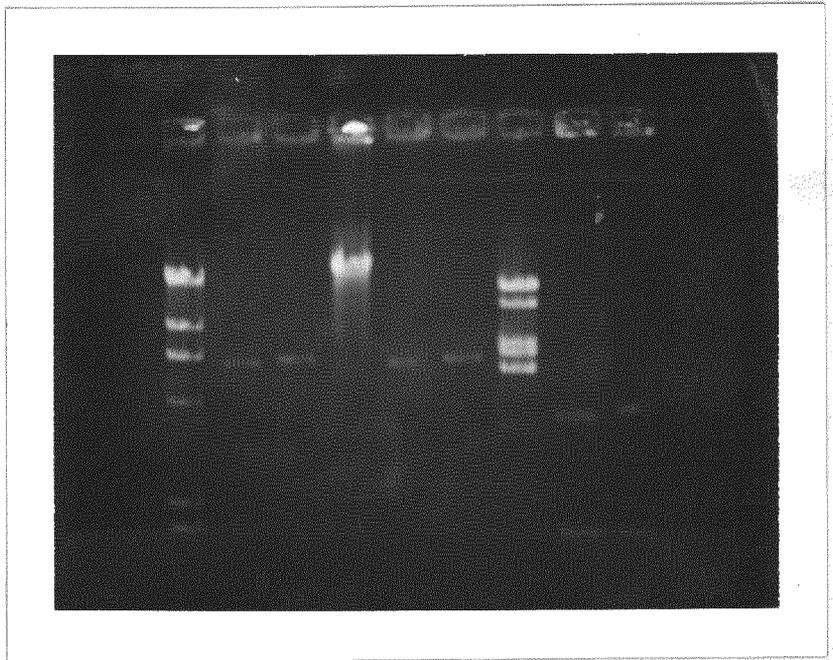


Figura 14.- Tratamiento de los plásmidos de 4'5 y 4'8 Mda con diferentes enzimas de restricción. A) λ + Hind III, B) 4'5 + Hind III, C) 4'8 + Hind III, D) λ + Hinc II, E) 4'5 + Hinc II, F) 4'8 + Hinc II, G) λ + Bam HI, H) 4'5 + Bam HI e I) 4'8 + Bam HI.

Esto nos hizo suponer la posible existencia de una analogía entre los plásmidos de 4'5 y 4'8 Mda; existe, no obstante, una secuencia de ADN aproximadamente de 0'3 Mda más en el plásmido de 4'8 Mda tal como puede apreciarse simplemente al comparar los pesos moleculares de los plásmidos.

Para cerciorarnos de estos resultados, procedimos a la transformación de una cepa de E. coli K12 C600 carente de plásmidos. Lo realizamos por el método de transformación con una solución hipotónica de Cloruro cálcico. La selección de transformantes se llevó a cabo en medio de Mueller-Hinton conteniendo Ampicilina a una concentración de 8 ug/ml, Trimetoprim a la misma concentración y Ampicilina más Trimetoprim a una concentración de 8 ug/ml cada uno.

Cuando transformamos con el plásmido de 4'8 Mda, obtuvimos transformantes con una frecuencia de $0'7 \times 10^{-4}$ en el medio selectivo que llevaba Ampicilina, la frecuencia de transformación en el medio con Trimetoprim fue de $0'6 \times 10^{-4}$ y en el de Ampicilina más Trimetoprim resultó ser de $0'4 \times 10^{-4}$.

Posteriormente comprobamos la resistencia de las cepas a Ampicilina y Trimetoprim mediante la realización de antibiograma por el método de dilución en agar.

También se verificó la producción de penicilinas por parte de las células transformadas y la existencia en las mismas del plásmido de 4'8 Mda, como puede observarse en la Figura 15.

Aunque todo apuntaba hacia el plásmido de 4'8 Mda como el portador de la información genética para la pro -

Peso molecular (Mda.)

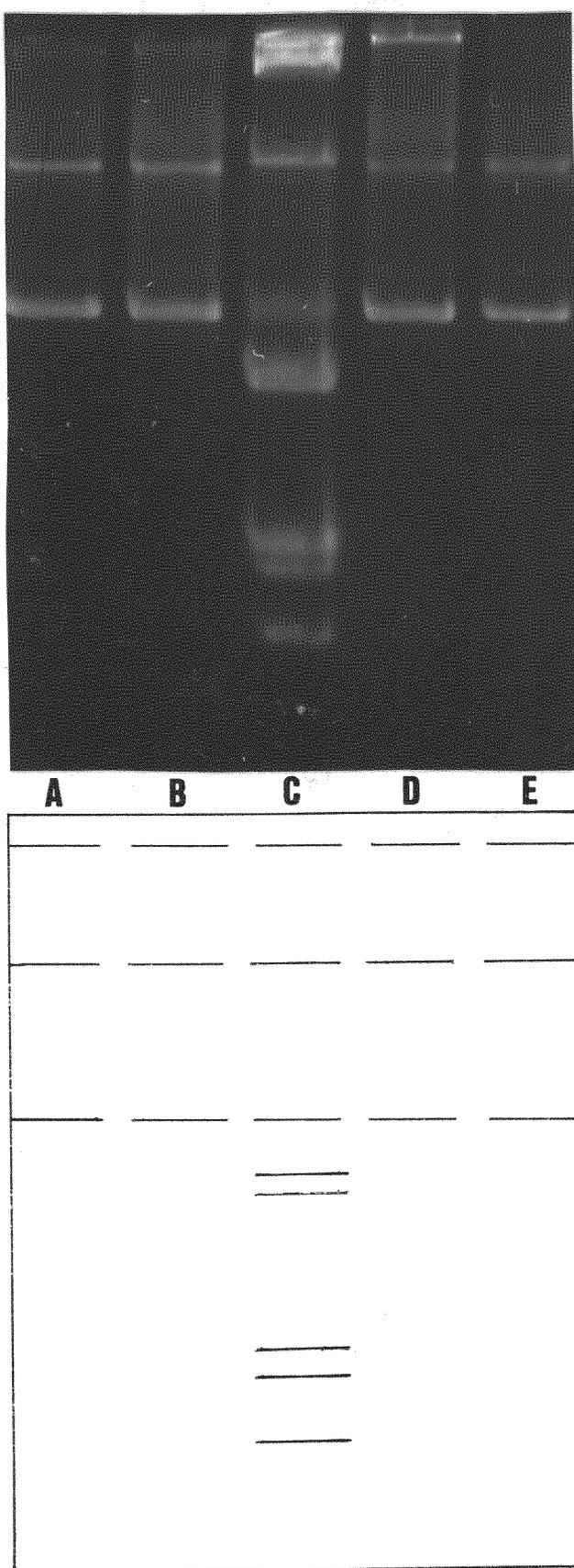


Figura 15.- Detección del contenido plasmídico de la cepa de E. coli K12 C600 transformada con el plásmido de 4'8 Mda de la cepa de N. gonorrhoeae 34/85. A), B), D) y E): plásmido de 4'8 Mda y C) plásmidos de la cepa patrón de E. coli V517

ducción de penicilinas y para la resistencia a Trimetoprim, para concluir el estudio, sometimos al plásmido problema a técnicas de hibridación con ADN de plásmidos de pesos moleculares y funciones conocidas.

Los plásmidos usados como sondas fueron el de 4'5 Mda de una cepa de N. gonorrhoeae productora de penicilinas y otros dos, procedentes de dos cepas de E. coli K12 C600 P39 y P700 que confieren a éstas, la capacidad de producir los enzimas dehidrofolato reductasa tipo I y II respectivamente, y que dan lugar a la resistencia a Trimetoprim.

Los resultados mostraron que, tanto con la técnica de hibridación en gota (Figura 16) como con la de Southern blot (resultado no mostrado), el ADN del plásmido de 4'8 Mda hibridó con el plásmido de 4'5 Mda.

También pudimos apreciar que la cepa de N. gonorrhoeae 34/85, debe llevar secuencias de nucleótidos semejantes a los que codifican la producción del enzima dehidrofolato reductasa tipo II ya que sólo hubo hibridación con el plásmido de la cepa de E. coli K12 C600 P700 (Figura 16).

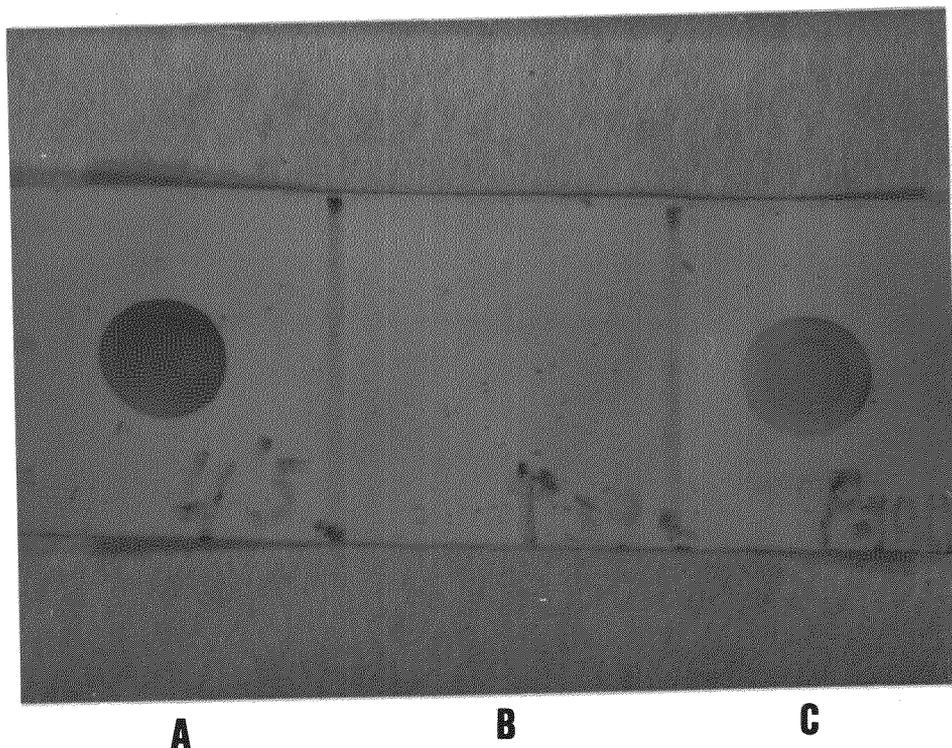


Figura 16.- Visualización de los resultados obtenidos en los estudios de hibridación mediante la técnica en gota. A) Hibridación del plásmido de 4'8 Mda con el de 4'5 Mda y C) Hibridación del plásmido de 4'8 Mda con el plásmido de la cepa de E. coli K12 C600 P700, responsable de la producción del enzima dehidrofolato reductasa tipo II.

DISCUSSION

A pesar de los notables avances que se han realizado en los últimos años en la comprensión de la patogénia y en la instauración de un tratamiento eficaz de la infección gonocócica, ésta sigue suponiendo un grave problema de salud pública debido a la alta incidencia con la que se presenta la infección y a la aparición de nuevas resistencias a agentes antimicrobianos por parte del microorganismo.

El panorama de la incidencia de la infección gonocócica varía según los diferentes países: en Suecia, gra --

cias a los programas de controles llevados a cabo, el número de casos ha disminuido desde el año 1.975, en EEUU, sólo se ha conseguido una paralización de la incidencia y el control se ve limitado por la aparición de endemias causadas por microorganismos que son resistentes a los tratamientos convencionales, bacterias que son responsables de un número cada vez mayor de infecciones gonocócicas. En los países en desarrollo a la alta prevalencia de la enfermedad, se le une el problema de las infecciones ocasionadas por cepas productoras de penicilinas, cuyos tratamientos alternativos, suponen unos costes económicos que superan los presupuestos de salud de estos países.

La diferenciación de las distintas cepas de N. gonorrhoeae, basada en la determinación de una serie de características del microorganismo, tales como la sensibilidad a antibióticos, existencia de plásmidos, requerimientos nutricionales, serogrupo y serotipo, entre otros, no sólo ha ayudado a la mejor comprensión de los brotes epidémicos debido a cepas productoras de penicilinas, al conocimiento de la diseminación temporal y geográfica de una cepa determinada e incluso a estudios médico-legales, sino que además ha posibilitado la caracterización biológica de las cepas, observando propiedades como resistencia a antibióticos, localización de la infección, expresión de la enfermedad, etc.

Dada la carencia de estudios de este tipo en nuestro país y el indudable valor que tiene el conocimiento de la epidemiología de una infección para su mejor conocimiento, comprensión y control, apunta a la necesidad de llevar a cabo la caracterización fenotípica de las cepas aisladas en nuestro medio.

1.- PRODUCCION DE PENICILINASA

Desde que en 1.976 se detectaran, por primera vez, cepas de N. gonorrhoeae productoras de penicilinasas simultáneamente en el Reino Unido y Estados Unidos, procedentes de Sudafrica y del Sudeste asiático respectivamente (37, 38, 39), éstas se han ido extendiendo a la mayoría de los países del mundo.

El problema es muy grave en lugares como el Lejano Oriente donde se estima que la proporción de cepas resistentes a Penicilina es de 50-60% (40) y en países del Oeste africano, como en Nigeria, donde el porcentaje de cepas productoras del enzima ha aumentado progresivamente desde 1.979 a 1.981 (12'45% a 50%) (41).

La incidencia de las infecciones causadas por cepas productoras de penicilinasas en Estados Unidos ha presentado un curso desigual. Desde 1.976 a 1.979 hubo un lento incremento y la mayoría de las cepas fueron importadas, el número de casos también aumentó desde 1.980 a 1.982 pero lo hizo rápidamente y no tuvieron relación con su adquisición en el extranjero. En 1.983 los casos disminuyeron, declarándose sólo 3.800, en comparación con los 4.500 declarados en 1.982. A esta disminución le ha seguido un incremento considerable pues en 1.985 y 1.986 se han declarado 8.800 y 16.648 casos respectivamente (42).

La situación de este problema en España no es bien conocida debido a la inexistencia de datos fiables que reflejen la verdadera realidad del tema, a excepción hecha de Cataluña en donde se ha podido comprobar un incremento del número de cepas resistentes a Penicilina (4'8% en 1.984 a 29'4% en 1.986) (43). Comunicaciones personales, también indican un incremento de este tipo de cepas en otros puntos de España como Bilbao, San Sebastian, etc.

En el Centro de Diagnóstico de Enfermedades de Transmisión Sexual de la Facultad de Medicina de Sevilla, desde que se detectara la primera cepa productora de penicilinas en 1.980, la incidencia ha ido aumentando y así en este trabajo, de 116 cepas de N. gonorrhoeae aisladas en el periodo de un año, 14 fueron productoras del enzima, correspondiendo a un 12%, incremento éste que como se ha apuntado anteriormente, ha coincidido con el aumento detectado en otras zonas de España.

El método que hemos empleado en este estudio para la detección de la producción de penicilinas, fue el descrito por O'Callaghan y cols. en el que se utiliza una cefalosporina cromogénica como sustrato de la reacción enzimática, ya que se ha considerado el procedimiento más sensible y de más fácil uso para la realización del ensayo (44).

El alto porcentaje de cepas productoras de penicilinas observado en este trabajo justifica el aislamiento de las cepas de N. gonorrhoeae y la detección, en todas ellas, de la producción del enzima, así como el disponer de un tratamiento alternativo dirigido a la población de alto riesgo como son: los fallos terapéuticos con Penicilina, los contactos de sujetos a los que se les ha aislado una cepa productora de penicilinas y los viajeros a países endémicos (45).

Es de primordial interés el seguimiento epidemiológico de las cepas productoras del enzima, seguimiento que se realiza controlando la respuesta terapéutica del paciente, así como tratando los contactos del mismo. Como se dijo en el apartado correspondiente a resultados, se actuó de modo eficaz en el tratamiento de los pacientes, pero por su falta de cooperación, no se pudieron tratar

a todos los contactos por lo cual, se supone que estas cepas se extendieron entre la población sexualmente activa.

2.- SENSIBILIDAD A AGENTES ANTIMICROBIANOS

Además de la resistencia a Penicilina mediada por plásmidos y como ya se ha venido indicando a lo largo de este trabajo, N. gonorrhoeae presenta también resistencia a este y a otros antimicrobianos determinada cromosómicamente, resultado de las mutaciones en varios loci cromosómicos, que dan lugar a alteraciones de la pared celular. Las mutaciones de dichos loci tienen efectos aditivos para la resistencia a Penicilina y pueden originar cepas resistentes desde 1 hasta 4 ug/ml.

Existen varios loci cromosómicos en N. gonorrhoeae, en los que las mutaciones originadas dan lugar a la producción de resistencia a Penicilina: pen A que sólo conlleva resistencia a B-lactámicos; pem que potencia la resistencia ocasionada por las mutaciones de los genes pen A; mtr que origina resistencia parcial a varios antimicrobianos como Penicilina, Tetraciclina, Eritromicina, Cloramfenicol, Rifampicina y Acido Fusídico y pen B o tem que incrementa los efectos expresados por mtr (46). Las mutaciones de estos genes se han asociado a alteraciones del peptidoglicano y al cambio en el peso molecular y cantidad de ciertas proteínas de la membrana externa del microorganismo (47).

La importancia de que existan cepas resistentes debido a mutaciones cromosómicas estriba, en que se desarrollan resistencia a varios agentes antimicrobianos a un mismo tiempo y en que son cepas endémicas en diversas zonas como Países Bajos, Lejano Oriente, etc., siendo además la causa de verdaderos brotes endémicos en algunos lu

gares de Estados Unidos (48). Pensamos que la extensión de estas cepas por todo el mundo, quizás sea sólo cuestión de tiempo, ya que además, no existe una prueba rápida de identificación, como ocurre en el caso de las cepas productoras de penicilinas, lo que facilitaría su diseminación.

Todo lo expuesto anteriormente plantea la necesidad de llevar a cabo estudios periódicos de la sensibilidad de este microorganismo, tanto a agentes antimicrobianos, considerados clásicos en el tratamiento de la infección gonocócica, como son: Penicilina, Tetraciclina, Espectinomicina, etc., como a agentes nuevos, posibles alternativas terapéuticas, de los que hemos incluido en nuestro estudio: Ceftriaxona, Ofloxacina y Ciprofloxacina.

Aunque existen innumerables estudios sobre la sensibilidad de N. gonorrhoeae, se hace difícil su comparación en distintas partes del mundo por razones técnicas, como el empleo de diferentes métodos, medios de cultivo, tamaño del inóculo, etc.

El método que hemos utilizado, la determinación de la C.M.I. mediante el método de dilución en agar, es el más extendido en los estudios de sensibilidad por tener una serie de ventajas sobre otros, como son: el conocer simultáneamente el valor de C.M.I. para un amplio número de microorganismos, determinar a la vez la C.M.I. de un mayor rango de diluciones del agente antimicrobiano, tener una buena reproducibilidad, etc.

Los medios de cultivo usados para la elaboración del antibiograma cuantitativo de N. gonorrhoeae son diversos y no ha existido hasta 1.987 una unidad de criterios para este tipo de estudio; en este año, el Center for Di-

seases Control (C.D.C.) recomienda medio GC suplementado con Isovitalex para este fin (42). Dado que nuestros estudios fueron llevados a cabo antes de la edición de estas normas y que en trabajos previos se había usado con buenos resultados el agar específico para pruebas de sensibilidad a antibióticos (DST agar) suplementado, éste fue el medio elegido por nosotros. El medio se suplementa con un 1% de Saponina que absorbe los ácidos grasos que son tóxicos para N. gonorrhoeae y con un 5% de sangre estéril de caballo.

Los valores de CMI_{50} y CMI_{90} (0'06 y 0'125 ug/ml, respectivamente) de Penicilina frente a las cepas de N. gonorrhoeae no productoras de penicilinas son ligeramente inferiores a los obtenidos por Hall (49) en Minnesota que encuentra un valor de CMI_{50} de 0'2 ug/ml y CMI_{90} de 0'5 ug/ml y por Dillon y cols. en Canadá (47) que hallan valores de CMI_{50} y CMI_{90} de 0'25 y 2 ug/ml respectivamente, pero coinciden con los de Piot en Bélgica (50).

Si consideramos la clasificación de las cepas de N. gonorrhoeae realizada por Meheus (51) que considera sensibles a Penicilina a las que se inhiben con una concentración menor de 0'05 ug/ml y relativamente resistentes a aquellas para las que los valores de CMI están comprendidos entre 0'05 y 0'5 ug/ml, hemos de decir que entre las cepas no productoras de penicilinas estudiadas por nosotros, hubo un 22'5% de cepas sensibles, un 74'5% de cepas relativamente resistentes y un 2'9% resistentes.

El número de cepas relativamente resistentes a Penicilina ha ido incrementándose en nuestro medio, desde 1.982, cuando no se detectó ninguna (52), hasta 1.985 - 1.986 cuando se encuentra el porcentaje referido anteriormente.

La frecuencia de estas cepas es algo más elevada que la encontrada en una serie de la República Federal Alemana en 1.984 (53), donde se detectó un 50%. No obstante, el problema en nuestro medio no es tan patente como en ciertos países del Lejano Oriente o de Africa, donde los valores de C.M.I. de Penicilina son muy elevados (40).

Teniendo en cuenta el número de cepas productoras de penicilinasas y el porcentaje de cepas moderadamente resistentes a Penicilina, concluimos que, en nuestro medio, ésta no debe ser el tratamiento de elección en la infección gonocócica de acuerdo con las directrices recomendadas por el C.D.C. (42).

Observando la tabla V vemos que los valores de CMI de Penicilina frente a las cepas no productoras de penicilinasas fue uniforme, no existiendo una distribución bimodal en la que se pudieran apreciar claramente dos tipos de poblaciones, una sensible y otra relativamente resistente como ha encontrado Meheus (51).

Como cabía esperar, los valores de CMI_{50} y CMI_{90} de Penicilina ante las cepas productoras de penicilinasas fueron mucho más elevados que los presentados para las no productoras.

En lo referente a Tetraciclina, se considera que N. gonorrhoeae es relativamente resistente cuando la CMI es mayor o igual a 2 ug/ml (54). Nuestras cepas se inhibieron a unas concentraciones equivalentes a las indicadas por otros autores, en España (Bilbao) (55) donde, de un total de 138 cepas, el 74% se inhibió con 1 ug/ml y el 26% restante con una cifra mayor de 2 ug/ml; 8 cepas productoras de penicilinasas requirieron más de 2 ug/ml,

lo que coincide con nuestros hallazgos ya que las cifras más elevadas de CMI de Tetraciclina corresponden a las obtenidas ante las cepas productoras del enzima. Esta asociación entre cepas de N. gonorrhoeae productoras de penicilinasa (portadoras del plásmido de 4'5 Mda) y la resistencia relativa a Tetraciclina ha sido descrita previamente por otros autores (56).

En base a los estudios donde se relacionan los porcentajes de fallos terapéuticos con Tetraciclina y la CMI, se estima que un 30% de aquellos, se correlacionan con valores de CMI mayores de 4 ug/ml (48).

Dado que la resistencia a Tetraciclina coexiste tanto en cepas productoras como no productoras de penicilinasa (más en estas últimas), no debería usarse este agente antimicrobiano en el caso de fracasos terapéuticos con Penicilina o Ampicilina.

En el caso de infecciones mixtas producidas por N. gonorrhoeae y Chlamydia tracomatis es aconsejable el uso combinado de Tetraciclina con otro antimicrobiano eficaz frente a N. gonorrhoeae.

Espectinomicina ha sido hasta hace poco la droga recomendada por el C.D.C. en casos de infección con cepas de N. gonorrhoeae productoras de penicilinasa; la resistencia a este antimicrobiano es rara, si bien el primer caso de cepa resistente ya fue declarado en 1.981 por el C.D.C. (57). Desde entonces se han detectado varios casos más y, en lugares como la República de Corea, el porcentaje de cepas altamente resistentes a Espectinomicina (CMI mayor de 100 ug/ml) ha aumentado hasta el punto de tener que sustituirla por Ceftriaxona en el tratamiento electivo de la infección gonocócica en el personal militar pro-

cedente de aquella zona (58).

En nuestro trabajo, Espectinomicina se comportó del mismo modo ante las cepas productoras y no de penicilinas, con valores de CMI_{90} igual a 16 ug/ml; autores como Hillton (59) consideran esta concentración como límite para estimar a una cepa como sensible o resistente. De aquí podemos inferir que este agente antimicrobiano seguiría siendo eficaz en nuestro medio para el tratamiento de infecciones por cepas productoras de penicilinas, tal como recomendaba el C.D.C.

A pesar de lo anterior, y debido a la presión selectiva ocasionada al instaurar tratamiento de la infección gonocócica con Espectinomicina, en la práctica clínica aconsejamos la colocación de discos de Espectinomicina con carga de 100 ug, cuando se realice antibiograma, para la detección de cepas resistentes según recomienda el C.D.C. (42).

En la literatura consultada hemos encontrado resultados variables, coincidimos con algunos autores como Hall (49), mientras que con otros como Coovadia en Sudafrica discrepamos, ya que éste encuentra a este agente, ligeramente más activo frente a sus cepas.

El 78'5% de las cepas fueron muy sensibles a Eritromicina, presentando una CMI menor de 0'06 ug/ml y no se encontró ninguna resistencia a este antimicrobiano (CMI mayor de 2 ug/ml) (61) quizás la razón de ello se deba a su uso infrecuente en el tratamiento de esta infección. Nuestras cepas fueron más sensibles que las estudiadas por Hall (49) y en Nairobi por Brunham (62).

Ceftriaxona y Ciprofloxacina fueron los dos agentes

más activos " in vitro ", y sus actividades no se vieron influidas por la producción de penicilinas. La estabilidad de Ceftriaxona a este enzima ha sido demostrada en trabajos realizados por Coovadia (60) y coincidimos con los valores de CMI observados en la literatura (49, 60, 63).

Ciertos autores (64) expresan que es el agente antimicrobiano más activo de todos los B-lactámicos estudiados hasta ahora frente a N. gonorrhoeae. Además, el que presente unas buenas características farmacocinéticas, tales como: una vida media de 8 horas, unos niveles séricos de 50 ug/ml a las 12 horas de la administración intramuscular de 0'5 g y una excelente distribución en los tejidos (65), hace que se piense en este antimicrobiano como una magnífica posibilidad terapéutica, sobre todo en el caso de cepas productoras de penicilinas como actualmente recomienda el C.D.C. (42).

Estudios llevados a cabo " in vivo " con este B-lactámico en el tratamiento de la infección gonocócica, han demostrado que la administración intramuscular de una dosis de 125 ó 250 mg curó todos los casos, fue bien tolerada y no causó toxicidad (66).

Ciprofloxacina fue el más activo de los dos derivados quinoleínicos estudiados; ni Ciprofloxacina ni Ofloxacina se vieron influidos por la actividad de la penicilinas y encontramos valores semejantes a los presentados por otros autores (67, 68).

Puesto que existen estudios farmacocinéticos en los que se demuestra que Ciprofloxacina se absorbe bien tras la administración oral, obteniéndose niveles medios de 2'4 ug/ml tras una hora y cuarto de la administración de

500 mg (69) y estudios llevados a cabo " in vivo " en los que se obtuvieron una eficacia del 100% con dosis de 100 mg, podríamos indicar Ciprofloxacina como otra alternativa para el tratamiento de la infección gonocócica no complicada. No obstante, parece que, a pesar de su relativa actividad " in vitro " frente a Clhamydia tracomatis y Ureaplasma urealyticum, una sola dosis muestra escasa eficacia clínica para prevenir el desarrollo de uretritis postgonocócica (70).

Ofloxacina fue menos activa que Ciprofloxacina, a pesar de lo cual, pueden considerarse como un agente con buena actividad " in vitro " ante este microorganismo. Una sola dosis de 200 mg produce niveles en suero de 2'3 ug/ml a las 2 horas, por lo que sería apto para el tratamiento con una dosis única (71). Ciertos trabajos que estudian su eficacia " in vivo ", muestran que con 100 mg se erradica a N. gonorrhoeae en el 100% de los casos, 84% se curaron clínicamente y el 16% desarrollaron uretritis postgonocócica (72).

3.- DETECCION DE PLASMIDOS Y CALCULO DE SUS PESOS MOLECULARES

Todos los métodos utilizados en los estudios de detección de ADN comparten una serie de puntos básicos: la recogida de las células por centrifugación, la lisis bacteriana y la purificación en mayor o menor grado del ADN (73).

La lisis bacteriana se realiza mediante la acción de Lisozima, enzima que actúa rompiendo la pared bacteriana, y de sustancias detergentes como el SDS, Triton X-100, Brij, etc., encargadas de desorganizar las membranas. La purificación se lleva a cabo eliminando, por centrifuga -

ción, los restos celulares desbridados y por la extrac --
ción de proteínas con ciertos solventes como el fenol,
cloroformo, alcohol isoamílico, etc.

La selección de un procedimiento sobre otro se hace de acuerdo con una serie de factores tales como el tamaño de los plásmidos que se esperan encontrar, la simplicidad y reproducibilidad del proceso, la especie bacteriana, la delicadeza del procedimiento y el uso al que va destinado el ADN plasmídico.

Para la búsqueda de los plásmidos directamente, a partir de colonias de cepas bacterianas, así como para el uso del ADN de ciertos procesos de transformación y clonación, no se requiere un alto grado de purificación del ADN.

En nuestro trabajo hemos estudiado tre métodos: el de Kado y Liu; el de Birnboim y Dolly modificado; y el de Eckhardt. Los dos primeros incluyen un proceso de precipitación diferencial, en el que las cadenas grandes de ADN cromosómico se eliminan, junto con el lisado celular, por la acción del calor en el primero y del Hidróxido sódico en el segundo; ésto, junto con la eliminación de proteí -
nas con fenol/cloroformo, hace que el ADN extracromosómi -
co que se obtiene se encuentre lo suficientemente purifi -
cado como para emplearlo en estudios de transformación, de digestión con enzimas de restricción, de unión por la enzima ligasa, etc. que requieren un grado de pureza del ADN mayor que el necesario para la simple detección del mismo.

Con el método de Eckhardt no se llega a ese grado de purificación del ADN, pero sí se obtiene un producto adecuado para la visualización de plásmidos a partir de cepas bacterianas y, dado que ofrece las ventajas de ser

más rápido y económico que los anteriores, junto con su nivel de reproducibilidad, hizo que nos inclináramos hacia él para emplearlo en la detección de factores extracromosómicos en N. gonorrhoeae.

La determinación del peso molecular de los plásmidos se puede realizar por diversos métodos, basados en la movilidad de los mismos en el gel de agarosa, unos, o en mediciones efectuadas en el microscopio electrónico, otros.

Con relación a los métodos que se basan en la movilidad electroforética del ADN, algunos autores como Meyers y cols. (74) y Willishaw y cols. (75), utilizando ADN se purificado proveniente de plásmidos de peso molecular conocido, han establecido que el rango de su migración en gel de agarosa al 0'75% a 120 V y 60 mA, es inversamente proporcional al logaritmo de su masa cuando su peso molecular variaba desde 1'8 hasta 8 Mda.

Macrina y cols. (76), mediante purificación de los plásmidos presentados por E. coli J53 V517 en gradiente de Cloruro de cesio, estimaron que existía una buena correlación entre la movilidad relativa de éstos en el gel de agarosa al 0'8% y su peso molecular, cuando se efectuaba la electroforesis a 90 V y 30 mA durante 2'30 horas. Todos estos autores asumen que la detección de plásmidos por electroforesis en gel de agarosa es un método muy sensible, no requiere tratamiento con radioisótopos ni ultracentrifugación y los resultados son comparables con los obtenidos por microscopía electrónica.

N. gonorrhoeae es uno de los microorganismos en el que se ha seguido con mayor interés la presencia de ADN extracromosómico, es por ello por lo que cada vez se van describiendo mayor número de plásmidos. Los pesos moleculares de los descritos en la literatura oscilan entre 2'6 y 25'2

Mda.

Aproximadamente, el 96% de las cepas de gonococo que se han estudiado albergan el plásmido de 2'6 Mda y puede encontrarse múltiples copias del mismo en una sola célula (77). Se ha demostrado que las cepas libres de este plásmido tienen un fragmento de aproximadamente 1'6 kilobases (kb) (1 Kb se corresponde a 0'61 Mda) del cromosoma bacteriano que hibrida con un fragmento de 1'65 Kb obtenido al cortar el plásmido de 2'6 Mda con el enzima de restricción Hinf I. La existencia de esta secuencia de ADN en el cromosoma ha suscitado la hipótesis de que este plásmido críptico tuviese algún poder sobre la reorganización de los genes del gonococo, pudiendo incorporarse éste en el cromosoma y dar lugar, así, a una nueva información genética (78).

Por otro lado, estudios realizados en 1.983 relacionan el plásmido de 2'6 Mda con la resistencia a Vancomicina ya que las cepas resistentes a este antibiótico (CMI mayor de 4 ug/ml) contenían el plásmido mientras que las cepas sensibles (CMI menor de 2 ug/ml) no lo presentaban (79). Esta relación explicaría la elevada frecuencia de aislamiento de cepas portadoras del plásmido, pues casi siempre se usan medios con dicho antibiótico, con carácter selectivo, para eliminar a la flora normal del lugar donde se toma la muestra, pero ésto no ha sido corroborado en estudios posteriores.

En nuestro trabajo, todas las cepas fueron portadoras de este plásmido, siendo además el único plásmido presente en el 62% de las cepas.

La aparición del plásmido de 2'6 Mda en todas nuestras cepas hace que pudiéramos elegirlo como marcador de identificación, usándolo como sonda, en técnicas de hibri-

dación de ADN, para el diagnóstico de infecciones ocasionadas por N. gonorrhoeae.

En nuestro estudio encontramos un plásmido de 7'8 Mda en 6 cepas; en 4 estuvo acompañado por el de 2'6 Mda y en la 2 restantes, por éste y por uno de 24'5 Mda.

Dicho plásmido se describió por primera vez en el año 1.983 y su estudio con enzimas de restricción mostró que se componía de 3 copias repetidas del plásmido de 2'6 Mda (y no parece que sea posible el desglose de este plásmido en otro de 5'2 y 2'6 Mda). Al igual que el de 2'6 Mda aún no se le ha podido adjudicar función alguna (80). Nosotros tampoco hemos encontrado ninguna relación entre su presencia y las características fenotípicas estudiadas.

Las primeras cepas productoras de penicilinas (tipo TEM-1, activa frente a Ampicilina), se aislaron simultáneamente en Estados Unidos y Reino Unido. Las cepas aisladas en Estados Unidos estuvieron ligadas epidemiológicamente con las del Sudeste asiático, llevaban un plásmido de 4'5 Mda, responsable de la producción del enzima, eran prototróficas o requerían Prolina, eran relativamente resistentes a Tetraciclina y en el 40% de ellas aparecía también el plásmido conjugativo de 24'5 Mda. Las cepas detectadas en Reino Unido procedían del Oeste africano, tenían el plásmido de 3'2 Mda, requerían Arginina y eran sensibles a Tetraciclina (56).

Estos hechos condujeron a considerar dos orígenes, casi simultáneos, de dos clones epidemiológicamente distintos, productores de penicilinas en dos áreas geográficamente diferentes; no obstante, tanto el plásmido de 4'5 Mda como el de 3'2 Mda, tienen en común el 40% del transposón TnA (81).

Mediante estudios de hibridación se pudo saber que eran homólogos y que lo único que lo diferenciaba era una secuencia de ADN de 1'3 Mda, presente en el plásmido de 4'5 Mda pero no en el de 3'2 Mda. Sox y cols (82) consiguieron transformar cepas de N. gonorrhoeae con el plásmido de 4'5 Mda; el 20% de los plásmidos albergados en las cepas transformadas fueron derivados por delección y el que se encontró más comunmente fue uno de 3'2 Mda que resultó ser idéntico al de 3'2 Mda de origen africano. Todo ésto sugiere que el plásmido de 3'2 Mda se originó a partir del de 4'5 Mda tras una transformación natural ya, que los gonococos se autolisan, liberando al medio ADN y prácticamente todas las cepas naturales, muestran capacidad de transformación.

A pesar de la clara localización geográfica que los plásmidos de 4'5 y 3'2 Mda tenían en un principio, a partir de 1.980 estos patrones establecidos empiezan a cambiar, no pudiéndose identificar una cepa productora de penicilinas como procedente de Africa o de Asia en base a los plásmidos que alberga, debido a la amplia difusión de ambos tipos de plásmidos en todo el mundo (56).

Recientemente se ha comprobado que los plásmidos portados por Haemophilus ducreyi productores de penicilinas son idénticos a los plásmidos R de N. gonorrhoeae, a excepción de que Haemophilus ducreyi contiene el transposon TnA completo. También se han aislado plásmidos semejantes a los de N. gonorrhoeae en Haemophilus parainfluenzae y Haemophilus influenzae. Estas observaciones conducen a dos posibilidades: o bien N. gonorrhoeae recibió los plásmidos de alguna especie de Haemophilus (probablemente de H. ducreyi dado que ambos comparten el mismo nicho ecológico), perdiendo un fragmento por delección, o bien a partir de un agente común, ambas especies recibie-

ron un mismo plásmido que evolucionó de modo distinto en cada una de ellas.

Posteriormente, se han descrito otros plásmidos responsables de la producción de penicilinas en N. gonorrhoeae. En 1.985 se reseña la existencia de uno de 2'9 Mda, denominado tipo Río debido a su procedencia (83). Se detectó en dos cepas, una se aisló en Rotterdam de un marino que posiblemente adquirió la infección en Durban, Sudafrica y otra en Amsterdam, de un paciente que adquirió la infección en Río de Janeiro. Parece que el origen de este plásmido está en el de 3'2 Mda.

En 1.986 se describe en Canadá, por primera vez, un brote de infecciones producidas por cepas productoras de penicilinas que portaban un plásmido R distinto a los de 3'2 y 4'5 Mda, dicho plásmido presentó un peso molecular de 3 Mda y se le ha denominado tipo Toronto. Se le ha relacionado con el plásmido asiático (4'5 Mda) ya que las cepas que lo albergan comparten con las asiáticas sus características de sensibilidad, su inhibición con Fenilalanina y su pertenencia al serogrupo WII/III. Por todo ello se especula que el fragmento de 1'3 Mda que falta en las cepas de tipo africano, puede estar implicado en algunas de estas características (84).

Por último, se ha descrito otro plásmido de 4 Mda, también productor de penicilinas que, al igual que los anteriores, parece poseer una composición semejante (85).

En el presente estudio, a excepción de una cepa productora de penicilinas que llevaba el plásmido de 3'2 Mda, las demás contenían el de 4'5 Mda; este hecho no coincide con lo expuesto por autores que implican al Oeste africano (cuyas cepas productoras de penicilinas lle

van el plásmido de 3'2 Mda) como fuente de cepas productoras del enzima en Europa, no obstante, como se observó anteriormente, la amplia difusión de las cepas productoras por todo el mundo explica la aparición de este tipo de cepas en nuestro medio.

No hemos detectado ninguno de los plásmidos responsables de la producción de penicilinas descritos recientemente, si bien más tarde pasaremos a discutir la genética de una cepa que nos sorprendió por contener un plásmido de diferente tamaño (4'8 Mda) a los hasta ahora publicados en la literatura.

El hecho de que tanto en nuestro medio como en otros puntos de España aumentase el número de cepas productoras de penicilinas, puede deberse a la aparición de un brote epidémico. La existencia de brotes epidémicos acontecidos en países no endémicos de cepas productoras del enzima, como lo es el nuestro, puede deberse, bien a la importación de uno o más tipos de cepas procedentes de países extranjeros, o bien a la transmisión en la población bacteriana indígena del plásmido responsable de la producción de penicilinas, a partir de una cepa importada. El esclarecimiento de lo ocurrido en nuestro medio sólo podrá venir dado por el estudio epidemiológico de las cepas aisladas.

Entre los primeros plásmidos detectados en N. gonorrhoeae se encuentra uno conjugativo, de 24'5 Mda de peso molecular. Cuando se quiso relacionar con la resistencia a antimicrobianos se pudo comprobar que existía tanto en cepas sensibles como en las resistentes con lo que se desechó tal asociación (86).

Este plásmido es capaz de movilizar plásmidos R entre cepas de N. gonorrhoeae, o de éstas a Haemophilus in-

fluenzae y Escherichia coli. También movilizan una variedad de plásmidos no conjugativos derivados originariamente de bacterias entéricas o especies de Haemophilus cuando los plásmidos se encuentran en Escherichia coli (15); no obstante, el plásmido no se detecta en cepas transconjugantes de Escherichia coli o Haemophilus influenzae, lo que sugiere que es inestable en estos huéspedes pero sobrevive transitoriamente, promoviendo las funciones de transferencia para la movilización (87).

También el plásmido conjugativo puede mediar la transferencia de genes cromosómicos, aunque no es imprescindible para ello. La frecuencia de transferencia de genes cromosómicos es baja, en contraste con la frecuencia de transferencia de plásmidos R, que en algunas cepas llega a ser aproximadamente del 10% en un periodo menor de 2 horas, y se ha podido comprobar que dicha frecuencia aumenta cuando se añaden pequeñas concentraciones de Penicilina en el medio de selección de los transconjugantes (88).

La frecuencia de aparición de este plásmido ha tenido hasta hace poco una distribución geográfica. En el Sudeste asiático, aparecía en un 40% de las cepas y era infrecuente en cepas de origen africano, lo que ha facilitado la diseminación del plásmido de 4'5 Mda entre las cepas de N. gonorrhoeae (88). Posteriormente, en Amsterdam, se han detectado cepas de N. gonorrhoeae con la combinación del plásmido de 3'2 Mda y el de 24'5 Mda (89) lo que hace pensar en la posible amplificación del problema de cepas resistentes a Penicilina.

Entre las cepas productoras de penicilinas de nuestro estudio, once presentaron el plásmido conjugativo, lo que indicaría una mayor facilidad por parte de estas ce -

pas para su establecimiento y extensión en nuestro medio, hecho que se encuentra apoyado por la alta frecuencia con que se encuentra también el plásmido conjugativo entre las cepas no productoras de penicilinas (25'5%).

Desde Febrero de 1.985 a Marzo de 1.986 se han descrito en Estados Unidos, 79 casos de infección gonocócica producida por cepas con resistencia combinada a Tetraciclina y Penicilina, mediada por plásmidos (90); posteriormente Zenilman y cols. expusieron que los altos niveles de resistencia a Tetraciclina pueden estar asociados con un plásmido de 25'2 Mda, que es el resultado de la inserción de un determinante de resistencia a Tetraciclina (Tet M) de origen estreptocócico en el plásmido de 24'5 Mda de N. gonorrhoeae. Este determinante Tet también ha sido encontrado en Mycoplasma hominis, Ureplasma urealyticum y Gardnerella vaginalis, de los que podrían haber pasado a N. gonorrhoeae bien por transformación o por conjugación (14).

En nuestras cepas no hemos detectado este plásmido y la resistencia observada tuvo su origen a nivel cromosómico.

4.- DETERMINACION DE LOS REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES O AUXOTIPIA

Durante 1.942 a 1.945 se demostró que las cepas de N. gonorrhoeae podían ser cultivadas en medios enriquecidos con componentes de la sangre, pero existía un considerable número de casos (más del 25%) que necesitaban un enriquecimiento adicional de Cocarboxilasa. En 1.973 cuando Catlin desarrolló un medio definido químicamente para este microorganismo, se identificaron muchos otros componentes esenciales en su crecimiento (22).

Si bien Hendry y Stewart (91) han desarrollado otro método para auxotipar N. gonorrhoeae, no se trata más que de una modificación del medio de Catlin que es, por otro lado, el más utilizado en la bibliografía consultada.

El medio ideado por Catlin, define los requerimientos nutricionales de N. gonorrhoeae, N. meningitidis y N. lactamica. Cada especie de Neisseria tiene un patrón nutricional que lo diferencia de las otras especies, asimismo, distingue entre sí distintas cepas de N. gonorrhoeae.

El medio de agar completo químicamente definido (NEDA), contiene los elementos necesarios para el crecimiento de la mayoría de las cepas aisladas a partir de muestras clínicas. El crecimiento en este medio es necesario para identificar un aislamiento de N. gonorrhoeae antes de tiparlo. Los medios que se precisan para conocer los requerimientos nutritivos se obtienen al restar del medio completo uno o más de sus componentes; de estos medios, el que carece de Cistina y Cisteína es imprescindible para la identificación de N. gonorrhoeae ya que todas las cepas requieren estos elementos para su crecimiento. El hecho de ver crecimiento en NEDA y en NEDA sin Cistina y Cisteína, constituye una evidencia presuntiva de que no se trata de N. gonorrhoeae.

Con este sistema Catlin describió 35 auxotipos diferentes, reflejando así el número de genes relacionados con los cambios biosintéticos del microorganismo, que pueden verse afectados por diversas mutaciones ocurridas espontáneamente y que pueden ser, a veces, dobles en una misma cepa.

Aunque el sistema presente diversos problemas y sea

relativamente complicado, ha sido, hasta la década de los 80, uno de los más empleados para el estudio epidemiológico de N. gonorrhoeae. Algunos de los problemas que plantean son, entre otros: requerir catorce medios distintos, así como tiempo para su obtención y la necesidad de un laboratorio equipado, la fácil contaminación de los medios al introducir inadvertidamente compuestos químicos no requeridos, el hecho del sintropismo o interacción que acontece entre cepas de N. gonorrhoeae que crecen unas al lado de las otras, suministrando productos que promueven el crecimiento de gonococos auxotrofos y la posible contaminación de cultivos, aparentemente puros, de N. gonorrhoeae con Mycoplasma hominis, pues ambos microorganismos coexisten en el tracto genital humano y con relativa frecuencia se aíslan juntos. Al igual que en el sintropismo, Mycoplasma se encarga de suministrarle aminoácidos, cofactores o vitaminas (92).

Los auxotipos más frecuentemente encontrados varían según el lugar donde el paciente adquiriera la infección, la población del área en estudio, las variaciones temporales que se producen en un lugar determinado, así como la naturaleza de la infección (93).

Hasta hace poco tiempo, las cepas de los auxotipos 1 (Prototróficas), 2 (Pro⁻) y 3 (Arg⁻) eran las más comunes, aunque un gran número de aislamientos tenían un requerimiento múltiple, tal es el caso del auxotipo 14 (Arg⁻ Hyx⁻ Ura⁻) que también se presentaba con relativa frecuencia.

Catlin en 1.973 (22) mostró que, de 251 cepas estudiadas, el 33'8% requirieron Prolina, el 25'5% fueron prototróficas, las que necesitaron Arginina representaron el 17'5% y un 9'6% precisaban Arginina, Hipoxantina y Ura⁻cilo.

Aunque Catlin encuentra que con su sistema se puede clasificar aproximadamente el 99% de la población bacteriana, en nuestro estudio sólo alcanzamos el 94%; ello puede venir explicado por la existencia de una mayor proporción de cepas de N. gonorrhoeae " fastidiosas ", que son especialmente sensibles a los ácidos grasos libres preexistentes en el medio o producidos por la propia bacteria, y cuyo crecimiento en el medio NEDA puede pasar de sapercibido (22).

En nuestro trabajo pudimos detectar 13 grupos diferentes de cepas según sus requerimientos nutricionales, de los que 5: Pro⁻ Ura⁻, Pro⁻ Hyx⁻ Ura⁻, Pro⁻ His⁻ Hyx⁻, Hyx⁻ e Hyx⁻ Ura⁻, no se encontraban dentro de los primeros 35 grupos descritos por Catlin; no obstante, otros autores han encontrado que un alto porcentaje de las cepas estudiadas (23'6%) tampoco se pudieron englobar en ninguno de los auxotipos de Catlin (94).

Según parece la mayor variabilidad de auxotipos depende del lugar donde se hagan los estudios ya que, en los países en desarrollo, la mayoría de las cepas, se pueden clasificar en tan sólo 2 grupos: no requirientes y Pro⁻ mientras que, en países desarrollados, presentan más de 20 auxotipos diferentes. También se sabe que en las -- ciudades más pobladas hay mayor variabilidad de auxotipos que en las de menor número de habitantes, reflejando quizás su carácter cosmopolita, aunque todo ello podría estar relacionado con una mejor capacidad diagnóstica en estos lugares (95).

En nuestro estudio hubo mayor variabilidad de auxotipo entre las cepas no productoras de penicilinas que entre las productoras, explicable por el número menor de cepas del segundo tipo; no obstante esta mayor variabilidad parece confirmarse en otros trabajos publicados en

los que el número de cepas productoras del enzima es mayor (96), de aquí se puede inferir, tal como lo han hecho otros autores, la existencia de una relación entre la capacidad de producir penicilinas y ciertos requerimientos nutricionales.

En nuestra población, las cepas que aparecieron más frecuentemente fueron las que necesitaron Prolina, que constituyeron un 38'8%, cifra semejante a la de Catlin; a este auxotipo perteneció el 12'7% de las cepas aisladas en Estocolmo en 1.975 y es también el auxotipo más común en el Lejano Oriente, junto con el auxotipo 1 o no requiriente (97). Según parece, este tipo de cepas va siendo sustituido por aquéllas que son Arg^- , $\text{Pro}^- \text{Cit}^- \text{Ura}^-$ o Ura^- (98).

Como se comentó anteriormente, las cepas productoras de penicilinas que llevan el plásmido de 4'5 Mda se correlacionaron desde un principio, con cepas Pro^- ; este hecho se ve corroborado en nuestro estudio, ya que de 13 cepas productoras de penicilinas, cuyo plásmido responsable fue el de 4'5 Mda, 11 fueron Pro^- y una requirió, además de este aminoácido, Hipoxantina y Uracilo.

También la cepa productora de penicilinas que presentó el plásmido de 3'2 Mda requirió Prolina junto con Hipoxantina e Histidina, en contraposición con la relación establecida desde hace tiempo entre cepas de este tipo y la necesidad de Arginina para su desarrollo. No obstante, y según se desprende de los trabajos realizados por diversos autores (89, 99, 100), desde que se hicieran los primeros estudios epidemiológicos de cepas productoras del enzima, se ha apreciado una dinámica notable en dicha población, extendiéndose los plásmidos responsables de la resistencia a Penicilina entre cepas cuyos auxotipos no fueron descritos originariamente.

Algunos autores han querido ver en la auxotipia la explicación racional de los cambios de sensibilidad de N. gonorrhoeae a los diferentes agentes antimicrobianos (101) y, de este modo, se ha observado que entre los aislamientos que necesitan Prolina se incluyen cepas que son menos sensibles que otras de distinto auxotipo; no obstante, esta hipótesis no se ha podido consolidar debido a la existencia de cepas Pro⁻, muy sensibles o relativamente resistentes a Penicilina G (102).

El ejemplo más claro de relación entre auxotipia y diferente sensibilidad a antimicrobianos ha sido el de las cepas Met⁻ y la resistencia a Sulfamidas; las cepas Met⁻ tienen una relación en el enzima sintetasa del ácido dihidropterico que reduce selectivamente la afinidad a la Sulfamida, en comparación con el ácido paraaminobenzoico (103).

En nuestro medio, se ha encontrado una correlación entre cepas menos sensibles a Penicilina y Tetraciclina y aquéllas que necesitaron Prolina; no obstante, al desglosar la población total en cepas productoras de penicilinas, se pudo observar que la asociación mencionada fue debida a las cepas productoras de penicilinas, siendo los plásmidos los responsables más directos de la disminución de la sensibilidad a los agentes antimicrobianos. Otros autores, como Van Klingerén (102), no implican exclusivamente a los plásmidos en esta disminución de la sensibilidad sino que involucran también a ciertas exigencias nutricionales.

Las cepas cuyos auxotipos siguieron en frecuencia a las anteriores en nuestro medio fueron las del número 1 o no requirientes y las que necesitaron Hipoxantina, presentándose ambos grupos en un 15'5%.

Para la mayoría de los autores uno de los grupos de cepas más comunes es el formado por cepas no requirientes; ésto se ha podido observar en todos los puntos de la geografía mundial donde se ha llevado a cabo este tipo de estudio y es uno de los auxotipos que va en aumento, abarcando, además, tanto a cepas productoras como no de penicilinas (97).

Al igual que ha ocurrido con las cepas que necesitan Prolina, las prototróficas también se han correlacionado con diferente sensibilidad a agentes antimicrobianos. En oposición a lo publicado por otros autores que hallan a las cepas prototróficas menos sensibles a Penicilina y Tetraciclina (104), las nuestras fueron más sensibles a Penicilina; con respecto a Tetraciclina, no hemos encontrado asociación alguna. Todo ello nos hace pensar que, en la relación que estamos discutiendo, más que el auxotipo, lo que realmente interviene es el mayor o menor grado de sensibilidad que presentan las cepas de un lugar geográfico determinado, que podría atribuirse a la mayor o menor presión selectiva ejercida por el distinto uso de antimicrobianos.

La menor sensibilidad a Ofloxacina y cepas prototróficas no hemos podido constatarla con otros autores dado la inexistencia a trabajos de este tipo, empleando este derivado quinoleínico.

Hemos podido encontrar una relación entre requerimientos nutricionales y preferencia sexual del paciente; de este modo, se ha observado que las cepas prototróficas se asociaron, sobre todo, a varones homosexuales, hecho que coincide con lo publicado por Givan y cols. (10) y puede venir explicado por tres razones: 1) Como ya apuntaba Catlin y Pace (105), porque la capacidad que tiene

N. gonorrhoeae de colonizar diferentes lugares anatómicos del sujeto depende de los requerimientos nutricionales, tendiendo las cepas aisladas de pacientes homosexuales a demandar pocos nutrientes, 2) porque estas cepas presen - ten una menor permeabilidad y, con ello, mayor resisten - cia a sustancias como ácidos grasos, que existen en gran cantidad en recto y que son perjudiciales para el creci - miento del gonococo (10) o 3) porque el círculo de homo - sexuales de una ciudad determinada tenga una estrecha re - lación entre sí y sea la misma población de gonococos la que se encuentre en ese grupo de pacientes.

Es interesante señalar que hemos detectado un por - centaje bastante elevado (15'5%) de cepas que requieren Hipoxantina para su desarrollo; este tipo de cepas no ha sido descrito por Catlin, pero sí por otros autores (12). Además de éstas, otro 10'3% de las cepas, requirieron Hi - poxantina junto con otros aminoácidos, de lo que podemos inferir que éste es un rasgo propio de las cepas aisladas en nuestro medio. También hemos de destacar, que se ha en - contrado una relación entre los requerimientos de Hipoxan - tina y mayor sensibilidad de las cepas a Penicilina y Cef - triaxona, sin poder determinar exactamente cual es la ra - zón, molecular o biológica, de esta asociación.

Hipoxantina forma parte de diversos auxotipos des - critos por Catlin, entre ellos, el número 14 (Arg⁻ Hyx⁻ Ura⁻), del que se ha podido demostrar, en innumerables ocasiones, su relación con una mayor sensibilidad a Peni - cilina y paradójicamente, con la producción de I.G.D. por parte de estas cepas. La implicación de estas cepas en la I.G.D., viene favorecida por una serie de hechos entre los que destacamos: la resistencia que presentan dichas cepas a la acción bactericida del suero (106); el poder quimiotáctico, " in vitro ", para los polimorfonucleares menor, que el presentado por otras cepas (107) y la ma -

yor frecuencia con que producen infección asintomática, hecho corroborado en trabajos donde se puede observar como los homosexuales, en los que estas cepas son infrecuentes, presentan pocos casos de infección asintomática (10); y por último, al hecho de ser más refractarias a una sola dosis de Penicilina debido, según los algunos autores, a que las concentraciones inadecuadas de Hipoxantina y Ura-cilo en la mucosa de los sujetos infectados por cepas AHU⁻ harían que no creciera bien el microorganismo y, al no existir una buena multiplicación, la Penicilina que actúa en la pared bacteriana de células en crecimiento, no actuaría correctamente y las bacterias que no se multiplicarían durante su exposición a Penicilina sobrevivirían (108).

A pesar de todos estos puntos que favorecen la relación entre las cepas Arg⁻ Hyx⁻ Ura⁻ con la I.G.D. y de que hay numerosos autores que detectan una disminución de casos de I.G.D. cuando disminuye la incidencia de cepas Arg⁻ Hyx⁻ Ura⁻, últimamente se está cuestionando todo ello y se está implicando más a un determinado tipo de proteína principal de la membrana externa como responsable de este hecho. En Atlanta, la mayoría de las I.G.D. no están causadas por cepas Arg⁻ Hyx⁻ Ura⁻ y si lo están por otras de distintos auxotipos que, al igual que las AHU⁻, pertenecen al serogrupo WI (109).

Aunque este auxotipo se encuentra ampliamente repartido por todo el mundo con una frecuencia que oscila entre el 8% en Francia y el 57% en Estocolmo (110), en las cepas de nuestro medio no ha aparecido; por otra parte, ninguno de nuestros pacientes fue diagnosticado de I.G.D.; tampoco se ha encontrado este auxotipo en otros países como Kenia, Suiza, Senegal, Argentina, Japón, etc. (110).

La influencia de este auxotipo en la sensibilidad a Penicilina se ha puesto de manifiesto en estudios realizados por Noble y cols. (111) donde, antes de 1.978 este auxotipo, era más frecuente en pacientes blancos que en negros, siendo las cepas de la primera población más sensibles a Penicilina; a partir de 1.978, se detectó una igualdad en cuanto a la sensibilidad de las cepas procedentes de ambos tipos de pacientes, resultado del desplazamiento de las cepas Arg⁻ Hyx⁻ Ura⁻ por otras cuyo auxotipo es Pro⁻ Cit⁻ Ura⁻, que se ha correlacionado con cepas relativamente resistentes a Penicilina.

Desde que se detectara por primera vez este último auxotipo en un estudio realizado en Canadá en 1.978, también se ha encontrado en otros lugares como Suecia y algunos puntos de Estados Unidos. En Canadá, en 1.981 fue el segundo grupo más común y se ha podido comprobar que cada vez son más numerosas en el hemisferio Norte. Estas cepas se caracterizan, además, porque se hallan libres del plásmido críptico de 2'6 Mda y se relacionan con casos de infección asintomática (107).

5.- DETERMINACION DE LOS SEROGRUPOS Y SEROTIPOS

Los estudios epidemiológicos de N. gonorrhoeae basados en la auxotipia, que tuvieron tanto desarrollo en los años 70, cada vez van siendo desplazados por los de tipo serológico. La antigenicidad de N. gonorrhoeae fue demostrada ya hace 60 años; muchos autores han propuesto y descrito sistemas de serotipación, pero ninguno se usó de modo general y no ha sido hasta la década de los 80 cuando se han desarrollado sistemas útiles para el estudio epidemiológico del microorganismo.

El desarrollo de la serotipación se ha logrado basándose, sobre todo, en la antigenicidad de la proteína

principal (proteína I) de la membrana externa y dentro de esta proteína, se han centrado en los antígenos denominados " W " por ser estables " in vitro " e " in vivo ", ser independientes de la morfología colonial y resisten - tes a la acción del peryodato, características que no cum plían los otros antígenos denominados " J " y " M ".

Usando técnicas de aglutinación, se ha podido demos trar la existencia de 3 tipos de antígenos W: el I, II y III. Realizando mapeo peptídico se supo que las cepas WI tenían una molécula denominada IA y las del grupo WII, po seían otra molécula diferente, denominada IB; las cepas del grupo WIII, más que otra molécula distinta, contenían una variedad de la IB, por lo que a estas cepas se las in cluye en el mismo grupo que las ceps WII, que pasa a deno minarse WII/III.

Los dos grupos que han desarrollado los sistemas de más éxito son los dirigidos por el Dr. Knapp en Estados Unidos y la Dra. Bygdeman en Suecia; aunque con los dos sistemas reaccionan el 100% de las cepas y tienen un po - der resolutivo equivalente, el empleo de los dos para la clasificación de las cepas, permite una mejor diferencia ción de las cepas de N. gonorrhoeae (112).

El sistema de Knapp describe 18 serotipos en el gru po IA y 28 en el IB; el de Bygdeman, 12 serotipos en el IA y 38 en el IB y, a pesar de que los epitopos que se re conocen con ambos sistemas son diferentes, existe una co rrelación entre los dos.

Los anticuerpos monoclonales usados, se nombran con letras minúsculas, y la denominación del serotipo vendrá dada por las letras correspondientes a cada anticuerpo con los que aglutina la cepa en estudio. Estas letras i - ran precedidas por la letra A mayúscula si pertenecen al

serogrupo WI, y con la B mayúscula si pertenecen al serogrupo WII/III.

La serotipación aventaja a la auxotipación en que es mucho más fácil de realizar, no requiere laboratorios muy sofisticados ya que se trata de una reacción de aglutinación, es más reproducible y no parece que tenga reacción cruzada con otras bacterias, si bien hay que hacer dos indicaciones a este punto: primera, que los anticuerpos denominados "Bj" del sistema de Knapp y el "By" del de Bygdeman han reaccionado con cepas de N. meningitidis y de N. lactamica, por reacción con otros componentes del microorganismo como la proteína menor o el lipopolisacárido y la segunda, apoyando el punto anterior, recientemente Copley y Egglestone (113) han demostrado que la coaglutinación presentada por algunas cepas con anticuerpos monoclonales WI se debió a la reacción con epitopos de la proteína II y no de la I.

Una cepa de N. gonorrhoeae pertenecerá a un serogrupo o a otro pero raramente, por no decir nunca, a los dos pues, cuando se ha dado algún caso de reacción a los dos serogrupos y a un mismo tiempo, se ha podido demostrar posteriormente que se trataba de una infección mixta, ocasionada por dos cepas de N. gonorrhoeae (12).

La importancia de la proteína I no sólo viene determinada por su aportación epidemiológica sino que, además, se ha implicado en distintas formas de presentación de la infección gonocócica y en la resistencia por parte del microorganismo a agentes antimicrobianos; en este último aspecto interviene, como veremos más adelante, por su característica de ser una porina. En cuanto al primer punto mencionado, hay autores que indican la existencia de cepas de N. gonorrhoeae que presentan una determinada pro -

teína W cuyo peso molecular es de 36.000 daltons, que son resistentes a la acción bactericida del suero y que dan lugar a I.G.D. y, por tanto, han asociado dicha proteína con la capacidad del microorganismo para diseminarse. Esta relación, que fue aceptada en un principio, hoy día está en discusión ya que esa misma proteína se ha encontrado en cepas que dan lugar a infección gonocócica localizada (107).

También, y de forma aún no delucidada, se han asociado el serogrupo y el auxotipo con una determinada IgA proteasa producida por N. gonorrhoeae.

Por último, se ha apuntado hacia la proteína W como la posibilidad, de conseguir una vacuna ya que parece que aquella induce la respuesta de IgA secretora (116), que produciría en todas las infecciones gonocócicas por ser la proteína I constante en todas las cepas y estar en ellas en gran cantidad. No obstante, el inconveniente de esta posibilidad radicaría en la amplia variedad isogénica que presentan como ya hemos podido comprobar.

Existen numerosas publicaciones que indican una diferente distribución de los dos serogrupos en las distintas áreas geográficas y también entre cepas de N. gonorrhoeae productoras y no de penicilinas de una misma zona.

En nuestro medio, las cepas que aparecieron en mayor número fueron las pertenecientes al serogrupo WII/III (82 de 116 cepas), siendo el serogrupo más frecuente, tanto entre las cepas productoras como entre las no productoras de penicilinas. Este serogrupo es el más común también en Tailandia, Singapur, Corea, áreas de Europa, Canadá, Estados Unidos, Australia y Africa, en este caso, en la población de cepas no productoras de penicilinas

(8).

En un estudio realizado en diferentes ciudades de Suecia, se pudo observar cómo las cepas del serogrupo WII/III predominaron en las grandes ciudades y las del serogrupo WI en las ciudades pequeñas. Existen dos posibles hipótesis que expliquen este hecho, la primera se basa en la diferente sensibilidad a diversos agentes antimicrobianos; al ser las cepas del serogrupo WII/III más resistentes a antibióticos, la mayor presión selectiva de aquéllos, existente en las grandes ciudades, seleccionaría a las cepas WII/III y la segunda se apoya en la posible acción protectora de los anticuerpos creados frente a la proteína I del gonococo, al existir menor número de determinantes antigénicos en el serogrupo WI, en caso de que ocurriese una reinfección (más probable en grandes ciudades debido a una mayor posibilidad de contacto sexual con mayor número de parejas) sería más fácil que se produjera por una cepa WII/III dada su mayor variabilidad antigénica que por una del serogrupo WI, cosa no clarificada en el caso de tratarse de infecciones localizadas (115).

En lo referente a las cepas productoras de penicilinas, las procedentes del Lejano Oriente suelen ser del serogrupo WII/III en más del 75% y también son las más frecuentes en Suecia; sin embargo, las procedentes de África, Hong Kong y Filipinas parecen pertenecer en una mayor proporción al serogrupo WI (8).

El serogrupo de nuestras cepas productoras de penicilinas, (WII/III) es semejante al de las cepas de países europeos como Suecia, Alemania, Holanda, etc. También parece que los plásmidos responsables de la producción del enzima se mantienen de forma más estable en las cepas WII/III que en las del serogrupo WI.

A pesar de la mayor proporción de las cepas WII/III, sólo hubo una que perteneció, dentro de este grupo, al subgrupo WIII; al igual que aquí, estas cepas son infrecuentes en Suecia y, cuando aparecen, están en relación con una infección contraída en el extranjero. La fuente de origen de cepas WIII parece ser el Sudeste asiático y de este modo, en Bangkok y Corea, constituyen el 23% de las cepas WII/III (8).

En diversos apartados de este trabajo hemos indicado la relación encontrada por diversos autores entre la sensibilidad de las cepas a diversos antibióticos y determinados serogrupos. Las cepas que producen I.G.D. suelen ser más sensibles a Penicilina que otras y estas cepas pertenecen al serogrupo WI. Bygdeman y otros autores (116, 117) observaron la asociación entre cepas no productoras de penicilinas, más sensibles a Penicilina y a otros B-lactámicos, con el serogrupo WI. Las cepas de este serogrupo, con respecto a Penicilina, son más sensibles que las del serogrupo WII y éstas lo son más que las WIII, que parecen ser las responsables de los casos de reinfecciones debidas a la resistencia a antibióticos; este mismo hecho se ha observado en relación a Doxiciclina.

En nuestro estudio coincidimos con los autores anteriores, encontrando una diferencia significativa entre cepas con mayor sensibilidad a Penicilina y el serogrupo WI; no hemos encontrado esta diferencia con respecto a Tetraciclina y sí con Ceftriaxona, aunque no se ha podido referendar con los resultados obtenidos por otros autores dada la falta de trabajos que incluyan este agente antimicrobiano en tal sentido.

Mediante estudios de transformación de una cepa WI con el ADN procedente de una cepa resistente WII, que mostró una CMI alta de Penicilina, Doxiciclina, Eritromicina

y Estreptomycin, Bygdeman y cols. obtuvieron una cepa WII y, cuando ésta se usó como donadora, obtuvieron otra cepa WII. Demostraron que hubo un aumento del peso molecular de la proteína principal de la membrana externa de las cepas transformadas (118); ésto coincide con lo que publicó Sparling, en 1.974, acerca de que las mutaciones producidas en los loci mtr y pen B2 se asociaba con cambios concomitantes en la proteína principal. De todo esto se deduce que la distinta sensibilidad a los agentes antimicrobianos depende de la capacidad que tiene la proteína I, que es una porina, de dejar pasar a los antibióticos a través de la membrana externa.

La única correlación probada entre plásmidos y serogrupo incluye sólo a aquellos plásmidos responsables de la producción de penicilinas. El de 4'5 Mda se ha asociado en múltiples ocasiones con el serogrupo WII/III, así como el de 3'2 Mda con el serogrupo WI; esta regla parece cumplirse en nuestras cepas productoras del enzima, a excepción de una cepa del serogrupo WI que llevó el plásmido de 4'5 Mda. Esta última asociación se ha podido detectar en estudios realizados con cepas de origen africano, productoras de penicilinas (119), explicable por la incorporación del plásmido de origen asiático en cepas propias del lugar en cuestión, en este caso Africa.

También, y siguiendo con las cepas productoras de penicilinas, se cumple la relación establecida entre plásmido de 4'5 Mda y requerimientos de Prolina o cepas prototróficas y serogrupo WII/III. Para las cepas que portan el plásmido de 3'2 Mda se ha observado la asociación con el serogrupo WI y el auxotipo 1, es decir el no requerimiento de aminoácidos, cofactores o vitaminas, el auxotipo 2 (Pro^-) y el auxotipo 3 (Arg^-) (8). En la única cepa de nuestro estudio que llevó el plásmido de 3'2 Mda, no se ha apreciado esta relación.

A pesar del mayor número de cepas WII/III, la varia bilidad de auxotipos entre las cepas WI y WII/III fue prácticamente igual, existiendo dos auxotipos más en el serogrupo WII/III que en el WI.

Pudimos apreciar una serie de asociaciones entre auxotipia y serogrupo y, de este modo, hubo una relación estadísticamente significativa entre las cepas que requirieron Hipoxantina, sola o unida a Prolina, con el sero - grupo WI. Esto junto con la relación encontrada entre re - querimientos de Hipoxantina y mayor sensibilidad a deter - minados agentes antimicrobianos, así como a la alta fre - cuencia con que nuestras cepas requieren este aminoácido, nos hace suponer que este tipo de cepas podrían tratarse de un rasgo epidemiológico propio de nuestra área geográ - fica.

La distribución de las cepas WI y WII/III en nues - tro estudio fue la misma entre hombres y mujeres. No ocu - rre lo mismo en otros lugares donde las cepas WI fueron más frecuentes en mujeres (97); en los varones los ca - sos de infección asintomática están producidos por cepas WI y ésta sería una de las explicaciones de la menor dete - cción de cepas WI en hombres y si bien hay un mayor núme - ro de infecciones asintomáticas en las mujeres, no se sa - be a qué serogrupo pertenecen las cepas que las producen.

Como hemos adelantado anteriormente, hubo una aso - ciación entre las cepas WII/III y su procedencia de varo - nes homosexuales como han encontrado otros autores (11).

En las cepas de la población de homosexuales, se en - contró una ligera disminución de la sensibilidad a Penici - lina pero no a Tetraciclina como ha sido descrito. Según los trabajos consultados en la bibliografía, tanto las ce -

pas WI como las WII/III procedentes de varones homosexuales son más resistentes a Penicilina, Ampicilina, Cefuroxima y Doxiciclina que las WI y WII/III pertenecientes a pacientes de distinto grupo poblacional y del mismo lugar (120).

Las cepas WII/III de pacientes homosexuales suelen tener, con mayor frecuencia que las cepas del mismo serogrupo de pacientes no homosexuales, una mutación en el locus mtr que además de conferir resistencia a antibióticos, lo hace a detergentes y colorantes hidrofóbicos; la resistencia a sustancias hidrofóbicas haría que pudiesen sobrevivir en lugares donde predominen las mismas como es el recto; no obstante, otros autores apuntan que debe existir otra presión selectiva, independiente del medio hidrofóbico rectal para la explicación de este hallazgo ya que se ha podido observar cómo aislamientos procedentes de otros lugares anatómicos distintos al recto, en pacientes homosexuales, son también más resistentes (120); esto se ve corroborado por nuestro estudio ya que de las 14 cepas aisladas de pacientes homosexuales, sólo 2 fueron aisladas de muestras rectales.

Dado que se ha demostrado la buena correlación entre los dos sistemas de anticuerpos monoclonales empleados y debido a que el mayor número de trabajos consultados en la bibliografía determinan el serotipo por el sistema **GS**, la discusión la haremos considerando sólo este sistema.

Dentro del serogrupo WI, en nuestro estudio, los serotipos predominantes fueron el Aedhi, el Aedgkih y el Adgkih: el resto de las cepas WI (20'5%) pertenecieron a 4 serotipos poco frecuentes.

Las cepas del serotipo Aedih se presentaron en un

53% de los casos y a este serotipo perteneció una de las dos cepas productoras de penicilinas del serogrupo WI. Según diversos estudios, parece que el Sudeste asiático, también es, el foco de origen de estas cepas; en Suecia, aunque constituye el 45% de las cepas productoras del enzima, son raras entre las no productoras.

El serotipo Aedgkih se ha reconocido como el más común entre el serogrupo WI en Sidney, Singapur, es el predominante en Europa, especialmente en algunas ciudades de Escandinavia y América del Norte. En Sevilla, aunque constituye el 14'7%, cifra que podría aumentar a un 26'4% si incluyéramos en este grupo a las cepas Adgkih - dada la similitud entre ambos serotipos - no llega a las cifras que se presentan en los lugares mencionados. De esto podemos establecer una mayor semejanza con las cepas WI del Sudeste asiático que con las propias de Europa.

No detectamos ninguna cepa Ae entre las nuestras, al igual que ocurre en Escandinavia, donde son muy raras entre la población de cepas no productoras de penicilinas. Las cepas Ae son frecuentes en Africa y en algunas zonas del Oeste del Pacífico, Nordeste de Australia y no existen en el Sudeste asiático.

Singapur parece que es el foco epidemiológico de cepas inusuales del serogrupo WI; en nuestro medio pudimos detectar el serotipo Af dentro de ellas. Este mismo serotipo sólo ha sido descrito en Canadá y Singapur. También en este último lugar se han detectado cepas del serotipo Afe, que se halló asimismo en nuestro medio.

En el serogrupo WII/III hubo mayor variabilidad de serotipos que entre las WI, al igual que ocurre en otros estudios publicados (96). Entre las 82 cepas WII/III encontramos 16 distintos serotipos, siendo los más frecuen-

tes el Bajk (22%), el Bacejk (20'7%), el Back (15'8%) y el Bak (14'6%), el resto de las cepas (27'8%) pertenecieron a 12 serotipos poco comunes.

El serotipo Bajk está extendido por todas las regiones geográficas y, al igual que en nuestro estudio, es uno de los serotipos más frecuentes en todas las áreas excepto en Bangkok, Corea y Darwin (Australia).

Las cepas cuyo serotipo es el Bacejk son comunes en países escandinavos, a excepción de Noruega y es raro en otras regiones. Dadas estas premisas y debido a la alta frecuencia con que se da este tipo de cepas en Sevilla y la existencia de tres cepas productoras del enzima con este serotipo, podríamos pensar en la adquisición y adaptación de los plásmidos R en cepas autóctonas.

El tercer serotipo más frecuente en nuestro medio fue el Back que es raro en países escandinavos pero frecuente en países asiáticos. A este serotipo pertenecieron 6 cepas de las 14 productoras de penicilinasa por lo que podríamos inferir su relación epidemiológica con las del Sudeste asiático. No obstante, el resto de las cepas penicilinasa-positivas del serogrupo WII/III presentaron el serotipo Bak que fue el cuarto en frecuencia en nuestro medio y que es también frecuente en Escandinavia pero no en el Sudeste asiático, de tal modo que estas cepas podrían ser consecuencia de la extensión del plásmido asiático en cepas propias de Sevilla o bien, dado que la única diferencia con las cepas del serotipo Back es la reacción con el anticuerpo " c " (que suele dar una reacción muy débil), podría tratarse del mismo serotipo y por lo tanto tener su relación epidemiológica con el Sudeste asiático.

En estudios efectuados por Bygdeman (8), se ha po

dido observar cómo el Sudeste asiático es también fuente de cepas que presentan serotipos inusuales del serogrupo WII/III, de este modo el serotipo Bacjk es propio de allí y las que se aíslan en Suecia correspondientes a este serotipo suelen ser productoras de penicilinas e importadas. En nuestro medio, las cepas Bacjk fueron poco frecuentes.

Para finalizar diremos que la única cepa del serogrupo WIII fue la Begjkh; en Suecia, éste es el serotipo más frecuente, dentro de las escasas cepas que se detectan de este grupo.

La caracterización de las cepas de N. gonorrhoeae mediante la determinación de los parámetros que hemos mencionado a lo largo del estudio, tiene su aplicación práctica a la hora de conseguir una mejor comprensión de la dinámica de algunas cepas del microorganismo, importantes por presentar ciertas características como resistencia a agentes antimicrobianos, producción de I.G.D. etc. No cabe duda que cuantos más parámetros se determinen, más exacto será el conocimiento epidemiológico de esta enfermedad infecciosa.

Por regla general, el contenido en plásmidos, la autotipia y la serotipia, tienen reproducibilidad entre las cepas aisladas de un mismo paciente así como entre los pertenecientes a sus parejas sexuales. Sin embargo, en la literatura se halla descrito la pérdida de plásmidos R y el cambio de un serotipo a otro, pero no de serogrupo, en una misma cepa de la bacteria.

En nuestro estudio, y por regla general, las cepas pertenecientes a un mismo paciente, así como las de sus contactos fueron idénticas, aunque hubo una serie de casos en los que se encontró cierta discrepancia.

La pérdida de plásmidos puede ser relativamente común ya que, en cinco casos relacionados epidemiológica -- mente, las cepas coincidieron en auxotipos y serotipos, pero no en contenido plasmídico.

La pérdida de plásmido sería también la explicación lógica del caso 25/85 y 31/85, cepas pertenecientes a una pareja y en las que, presentando un auxotipo semejante y el mismo serotipo, una de las cepas fue portadora de tres plásmidos (2'6, 7'8 y 24'5 Mda) y la otra sólo llevó el plásmido de 2'6 Mda.

Las cepas 30/85, productora de penicilinasas y 33/85, no productora del enzima, que pertenecieron a una misma paciente y fueron aisladas con 7 días de intervalo, no coincidieron en ningún parámetro, por lo que cabe la posibilidad de que se tratara de una reinfección, hipótesis que se ve reforzada por el hecho de ser la paciente una prostituta.

Aunque las cepas 46/85 y 49/85 pertenecieron al mismo paciente y además fueron productoras de penicilinasas, se trataba de dos cepas distintas en relación al auxotipo y al serotipo, por lo que creemos que dicho paciente presentó una infección mixta, producida por dos cepas de N. gonorrhoeae.

Las distintas características de las cepas 30/86 y 32/86, aisladas de una misma paciente en un intervalo de 7 días, apuntaría hacia una reinfección, cosa que no pudo ser comprobado en la historia clínica.

En cuanto a las infecciones producidas por cepas productoras de penicilinasas, en el periodo de tiempo estudiado, hemos de decir, conociendo las características epidemiológicas, se sabe que no fue producida por un solo ti

po de cepas que se extendiese de paciente en paciente, si no que se trató de la introducción de, al menos, seis tipos de cepas distintas como puede observarse en la siguiente relación:

Plásmidos	Fenotipo	Serotipo	
		GS	Ph
2'6,4'5,24'5	Pro ⁻	Back	Bropyt
2'6,4'5,24'5	Pro ⁻	Bcegjk	Bpyust
2'6,4'8,24'5	Pro ⁻ Hyx ⁻ Ura ⁻	Back	Bropyt
2'6,4'5	Prototrófica	Aedgkih	Arost
2'6,4'5	Pro ⁻	Bacejk	Brpyust
2'6,3'2	Pro ⁻ His ⁻ Hyx ⁻	Aedih	Arst

6.- ESTUDIO GENETICO DE LA CEPA 34/85

El estudio genético que se está llevando a cabo en la especie de N. gonorrhoeae es uno de los apartados más importantes con el que se está contribuyendo al avance y conocimiento de la genética bacteriana.

Como se ha mencionado en este trabajo, los plásmidos R detectados en esta especie son cada día más numerosos, hecho que posiblemente continuará, debido al extenso uso de los agentes antimicrobianos en el hombre, único reservorio conocido para el gonococo y también a la gran extensión de plásmidos existentes en microorganismos de o-tros géneros y especies que comparten el habitat del gono-coco.

Entre las cepas estudiadas encontramos una, la numerada como 34/85 que portaba un plásmido de 4'8 Mda, desconocido hasta ahora y nos planteamos la realización de su estudio genético con el fin de conocer sus posi --

bles funciones.

Para ello, se realizó su aislamiento y posterior purificación. De los dos métodos de aislamiento estudiados por nosotros, optamos por el descrito por Cornelis y cols. ya que el grado de pureza tanto del ADN extracromosómico como del cromosómico conseguido, es mayor que el del ADN extraído por el método de lisis alcalina, que no lleva ningún paso de extracción de proteínas. Esta pureza se requiere cuando el ADN se va a usar para hibridar, transformar, etc.

La separación del plásmido problema de los coexistentes en la misma cepa (2'6 y 24'5 Mda) se hizo extraéndolo del gel de agarosa. Existen diversos métodos para esta finalidad, pero ninguno de ellos es plenamente satisfactorio. Existen dos problemas principales, el primero es que la mayoría de los tipos de agarosa, independientemente de su grado de pureza, se encuentran contaminados con polisacáridos sulfatados, que se extraen del gel junto con el ADN y dichas sustancias son potentes inhibidores de los enzimas (endonucleasas, ligasas, polimerasas, etc) que normalmente se usan en los estudios del ADN y segundo, que la cantidad de ADN extraída del gel está en función de su peso molecular, obteniéndose en una proporción satisfactoria, aquél cuyo peso molecular oscila entre 0'61 y 12'2 Mda.

Nosotros hemos usado tres métodos, dos de ellos consistieron en electroeluciones, es decir, se usó la corriente eléctrica para hacer salir el ADN desde el gel de agarosa a una solución y el tercero, se sirvió de la característica física de congelar y descongelar la agarosa, proceso que termina ocasionando una desestructuración de la matriz del gel con la consecuente liberación de las cadenas de ADN.

Aunque los métodos de obtención del ADN por electroelución, tanto por electroforesis vertical como por electroforesis en bolsa, fueron los más laboriosos y por lo tanto los que más problemas plantearon en relación a su montaje, el ADN recuperado por ambos métodos fue de buena calidad, que viene dada por la integridad del ADN, por la facilidad de ser digerido por enzimas de restricción, etc. Sin embargo, de los dos, elegimos el primero ya que dentro de la dificultad que entrañaba, fue el más fácil de realizar. El ADN recobrado por el método de congelación-descongelación tuvo una calidad menos aceptable y la cantidad fue más baja, por lo tanto fue descartado para su uso.

Los cortes obtenidos con los enzimas Hinc II y Hind III de los plásmidos problema (4'8 Mda) y patrón (4'5 Mda) fueron semejantes, observándose sólo y exclusivamente una banda de ADN que, por su localización en el gel de agarosa, se pudo saber que correspondía a la forma abierta de cada elemento extracromosómico. Esto está de acuerdo con lo publicado referente al plásmido de 4'5 Mda pues, al tener estos enzimas sólo una zona palindrómica de reconocimiento es este plásmido, la digestión con ellas únicamente abre el plásmido. El hecho de que la digestión del plásmido de 4'8 Mda, con Hinc II y Hind III de un fragmento localizado en el gel de agarosa ligeramente más arriba que el obtenido al cortar el plásmido de 4'5 Mda con los mismos enzimas, nos indica la diferencia de peso molecular que previamente conocíamos.

Coincidimos con lo descrito en la literatura referente al plásmido R de 4'5 Mda, en nuestro trabajo, la digestión de los plásmidos de 4'5 y 4'8 Mda con el enzima Bam HI produjo dos fragmentos. De ellos, el más pequeño presentó el mismo peso molecular en los dos casos (1'45 Mda ó 2'2 Kb), mientras que el mayor, (3'04 Mda ó 4'9

Kb y 3'35 Mda ó 5'39 Kb) presentó la diferencia de 0'3 Mda ó 0'4 Kb entre los dos plásmidos.

A la vista de todas estas consideraciones, podemos establecer la analogía entre los plásmidos de 4'5 y 4'8 Mda y la existencia de un pequeño fragmento de 0'3 Mda en el plásmido problema.

Para conocer la función que el plásmido de 4'8 Mda ejercía en la cepa que lo albergaba, realizamos estudios de transformación bacteriana con dicho plásmido; el ADN en estudio es incorporado en la célula, se replica y expresa la información genética que lleva, por ejemplo la resistencia a agentes antimicrobianos, permitiendo a la célula transformada sobrevivir en presencia del antimicrobiano.

La mayoría de los métodos de transformación bacteriana se basan en las observaciones de Mandel y Higa hechas en 1.970 (35), éstas indican que el tratamiento de las células bacterianas con Cloruro cálcico aumenta la captación de ADN. Sobre estos resultados hemos basado el método empleado en este trabajo.

El hecho de haberse conseguido células bacterianas transformadas en los tres medios selectivos empleados, cuando se transformó con el plásmido de 4'8 Mda y con una frecuencia de transformación muy similar (Ampicilina $0'7 \times 10^{-4}$, Trimetoprim $0'6 \times 10^{-4}$ y Ampicilina más Trimetoprim $0'4 \times 10^{-4}$ ug de ADN), indica que los genes que codifican la resistencia a Ampicilina y Trimetoprim se encuentran localizados en el mismo plásmido y que es el de 4'8 Mda el responsable en la cepa 34/85 de la resistencia a estos dos agentes antimicrobianos.

Pudimos corroborar este punto cuando se realizó el

antibiograma de las células transformadas. También pudimos demostrar que este plásmido fue el causante de la producción de penicilinas.

En las cepas de E. coli transformadas se detectó un plásmido de 4'8 Mda de peso molecular (igual al original), confirmando otros estudios en los que se comprueba que cuando se transforman cepas de E. coli con los plásmidos de N. gonorrhoeae éstos permanecen siempre inalterados, pero no ocurre así cuando se transforman cepas de N. gonorrhoeae, en las que tiene lugar una pérdida de un fragmento de ADN plasmídico, produciéndose un plásmido de 3'2 Mda (82).

Para conocer la localización plasmídica del gen responsable de la resistencia a Penicilina y Trimetoprim, se realizaron estudios de hibridación de ADN/ADN entre el plásmido de 4'8 Mda con: el plásmido de 4'5 Mda de N. gonorrhoeae y el contenido plasmídico de las cepas de E. coli K12 C600 P39 y E. coli K12 C600 P700 portadoras cada una de ellas de un plásmido con la información para producir el enzima dehidrofolato reductasa tipo I (la primera cepa) y dehidrofolato reductasa tipo II (la segunda cepa), que hace a las cepas resistentes a Trimetoprim. Tanto con la técnica de hibridación en gota como con la de Southern blot, hubo hibridación del plásmido de 4'8 Mda con el de 4'5 Mda y con el de la cepa de E. coli K12 C600 P700. Estos resultados confirman, en primer lugar la semejanza de los plásmidos de 4'5 y 4'8 Mda y en segundo lugar, que posiblemente el fragmento de 0'3 Mda contenga el gen responsable de la producción del enzima dehidrofolato reductasa tipo II que hace a la cepa resistente a Trimetoprim.

Estudios, que se están llevando a cabo actualmente en nuestro laboratorio, de digestión con enzimas de res -

tricción del plásmido problema e hibridación de los fragmentos mediante la técnica de Southern blot, nos llevarán a conocer con más exactitud cual es y donde se halla la secuencia de ADN que lleva la información genética para la síntesis del enzima dehidrofolato reductasa tipo II en la cepa de N. gonorrhoeae.

CONCLUSIONES

- 1.- El porcentaje de cepas de N. gonorrhoeae productoras de penicilinas durante el periodo estudiado (Julio 1.985 - Julio 1.986) fue del 12%, lo que supone el mayor porcentaje encontrado en nuestro medio desde que en 1.980 se detectara la primera cepa de este tipo. La proporción de cepas no productoras de penicilinas, relativamente resistentes a Penicilina, fue del 74'5% y el de las resistentes del 2'9%, todo lo cual demuestra que Penicilina no debe ser, en nuestro medio, el tratamiento de elección de la infección gonocócica.

- 2.- Considerando el alto porcentaje de cepas relativamente resistentes a Tetraciclina (CMI \geq 2 ug/ml) que hemos

encontrado: 92'8% entre las cepas productoras de penicilinas y 37'2% entre las no productoras, este antimicrobiano no debería usarse en los fracasos terapéuticos con Penicilina o Ampicilina.

- 3.- No hemos encontrado cepas de N. gonorrhoeae resistentes a Espectinomycin.
- 4.- La buena actividad " in vitro " de Ceftriaxona y Ciprofloxacina, tanto sobre cepas productoras de penicilinas como no productoras, hacen que se los indiquen como tratamientos alternativos en las infecciones gonocócicas, sobre todo las causadas por cepas productoras de penicilinas.
- 5.- Todas las cepas estudiadas de N. gonorrhoeae fueron portadoras de plásmidos, siendo constante en todas ellas el de peso molecular de 2'6 Mda, lo que hace que éste pueda ser un excelente marcador en la identificación de este microorganismo.
- 6.- La alta frecuencia de detección del plásmido conjugativo de 24'5 Mda, tanto entre las cepas de N. gonorrhoeae productoras como no productoras de penicilinas (78'6 y 25'5% respectivamente), supondría una mayor facilidad para el establecimiento y extensión de cepas portadoras de plásmidos R en nuestra población bacteriana.
- 7.- Por medio de la auxotipia, pudimos clasificar al 94% de las cepas de N. gonorrhoeae y, encontramos 12 diferentes auxotipos de los 56 hasta ahora descritos y detectamos además un fenotipo ($Pro^- His^- Hyx^-$) no hallado en la literatura. Las cepas de N. gonorrhoeae no productoras de penicilinas se distribuyeron entre los 13 auxotipos, mientras que las cepas que fueron productoras de penicilinas pertenecieron a tan sólo 4

de ellos.

- 8.- Las cepas que necesitaron Prolina fueron las más comunes en las dos poblaciones estudiadas, les siguieron en frecuencia las no requirientes o prototróficas y las requirientes de Hipoxantina.
- 9.- Dada la escasa frecuencia con que se presenta el requerimiento exclusivo de Hipoxantina en las cepas de N. gonorrhoeae y que el 15'5% de las estudiadas por nosotros necesitó dicho aminoácido, podemos inferir que este rasgo es distintivo de las cepas de N. gonorrhoeae de nuestro medio.
- ✓ 10.-No se ha demostrado relación alguna entre patrón de resistencia a antimicrobianos y auxotipos.
- ✓ 11.-El serogrupo WII/III fue el más frecuente tanto entre las cepas de N. gonorrhoeae productoras como no productoras de penicilinas.
- ✓ 12.-Hemos podido comprobar que las cepas del serogrupo WI presentaron mayor sensibilidad a Penicilina que las del serogrupo WII/III.
- 13.-Las cepas de N. gonorrhoeae aisladas de varones homosexuales fueron, con más frecuencia, prototróficas, pertenecieron al serogrupo WII/III y presentaron una menor sensibilidad a Penicilina que las cepas de otras poblaciones de pacientes.
- 14.-Dentro del serogrupo WI hubo una mayor homogeneidad de serotipos que entre el serogrupo WII/III, indicándonos una menor variabilidad isogénica en las cepas de aquél serogrupo, y el serotipo que se presentó con más frecuencia fue el Aedih.

- 15.-En el serogrupo WII/III, el serotipo más común fue el Bajk (22%), que es el serotipo más frecuente en la práctica totalidad de los países en los que se han llevado a cabo este tipo de estudio. Los serotipos que les siguieron en frecuencia fueron el Bacejk, común en países escandinavos y el Back, frecuente en el Sudeste asiático.
- 16.-Aunque el patrón que más se repitió entre las cepas de N. gonorrhoeae productoras de penicilinasas fue: la presencia de los plásmidos de 2'6, 4'5 y 24'5 Mda, el auxotipo 2 y la pertenencia al serogrupo WII/III, al considerar los serotipos, hubo una diversidad de éstos, lo cual nos indica que el mayor número de casos de infección gonocócica debida a cepas productoras de penicilinasas no se debió a la introducción de un sólo tipo de cepa.
- 17.-Encontramos una cepa de N. gonorrhoeae resistente a Trimetoprim y productora de penicilinasas cuyo plásmido responsable fue uno de 4'8 Mda, de peso molecular diferente a los descritos en la literatura hasta ahora.
- 18.-Los estudios con enzimas de restricción, transformación bacteriana e hibridación de ADN, mostraron que el plásmido de 4'8 Mda podría haberse originado por la inserción en el plásmido de 4'5 Mda, responsable de la producción de penicilinasas, de un fragmento de 0'3 Mda en cuya secuencia se localiza el gen que codifica la información para la síntesis del enzima dehidrofolato reductasa tipo II, que hace a la cepa resistente a Trimetoprim.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Swanson J, Mayer LW: Biology of Neisseria gonorrhoeae.
En: Holmes KK, Mårdh PA, Sparling PF and Wiesner PJ
(eds.). Sexually Transmitted Diseases. McGraw-Hill,
Inc. New York. 1.984 pp: 187-204.
- 2.- Diseases of the urogenital tract. En Cano RJ and Colo_
me JS (eds.). Microbiology. West Publishing Company.
St. Paul. 1.986 pp: 635-655.
- 3.- Ministerio de Sanidad y Consumo. Subdirección general
de información sanitaria y epidemiológica. Boletín E-
pidemiológico Semanal. 1.987 nº 1.767 pag. 2.

- 4.- Sparling PF, Sox TE, Mohammed W and Guymon LF: Anti - biotic resistance in the gonococcus: Diverse mecha -- nisms of coping with a hostile environmet. En Brooks GF, Gotschlich EC, Holmes KK, Sawyer WD, Young FE (eds.). Immunobiology of Neisseria gonorrhoeae.ASM. Washington, DC. 1.978 pp: 44-52.
- 5.- Mills J, Brooks GF: Disseminated gonococcal infection. en Holmes KK, Mårdh PA, Sparling PF and Wiesner PJ (eds.). Sexually Transmitted Diseases. McGraw-Hill, Hinc. New York. 1.984 pp: 229-237.
- 6.- Carifo K and Catlin BW: Neisseria gonorrhoeae auxoty - ping: differentiation of clinical isolates based on growth responses on chemically defined media. Appl. Microbiol. 1.973. 26: 223-230.
- 7.- Sandström EG, Knapp JS and Buchanan TM: Serology of Neisseria gonorrhoeae: W-antigen serogrouping by coa - gglutination and protein I serotyping by enzyme-lin - ked immunoabsorbent assay both detect protein I anti - gens. Infect. Immun. 1.982. 35: 229-239.
- 8.- Bygdeman SM: Policlonal and monoclonal antibodies ap - plied to the epidemiology of gonococcal infection. En Young H, McMillan A (eds.). Immunological diagnosis of sexually transmitted diseases. Marcel Decker, Inc. New York. 1.987 pp: 117-165.
- 9.- Bohnhoff M, Morello JA and Lerner SA: Auxotypes peni - cillin susceptibility and serogroups of Neisseria go - norrhoeae from disseminated and uncomplicated infec - tions. J. Infect. Dis. 1.986. 154: 225-230.
- 10.-Givan KF and Saeger R: Auxotypes of Neisseria gonor -

- rhoeae from heterosexual men, homosexual men and heterosexual women. Sex. Transm. Dis. 1.986. 13: 19-23.
- 11.- Reid G and Young H: Serogrouping Neisseria gonorrhoeae: correlation of coagglutination serogroup WII with homosexually acquired infection. Br. J. Vener. Dis. 1.984. 60: 302-305.
- 12.- Bygdeman SM, Danielsson D and Sandström E: Serological classification of Neisseria gonorrhoeae by coagglutination: a study of serological patterns in two geographical areas of Sweden. Acta Dermatovener. (Stockholm). 1.981. 61: 423-427.
- 13.- Knapp JS: Introduction. En Shoolnik GK, Brooks GF, Falkow S, Frasch CE, Knapp JS, McCutchan JA, Morse SA (eds.). The Pathogenic Neisseriae. ASM. Washington, DC. 1.985 pp: 3-5.
- 14.- Morse SA, Johnson SR, Biddle JW and Roberts MC: High level tetracycline resistance in Neisseria gonorrhoeae in result of acquisition of Streptococcal Tet M determinant. Antimicrob. Agents. Chemother. 1.986. 30: 664-670.
- 15.- Roberts M, Elwell L and Falkow S: Introduction to the mechanisms of genetic exchange in the gonococcus: plasmids and conjugation in Neisseria gonorrhoeae. En: Brooks GF, Gotschlich EC, Holmes KK, Sawyer WD, Young FE (eds.). Immunobiology of Neisseria gonorrhoeae. ASM. Washington, DC. 1.978 pp: 38-43.
- 16.- Brunton J, Meier M, Maclean I, Slaney L and Albritton WL: Molecular epidemiology of Beta-lactamase-speci -

- fyng plasmids of Haemophilus ducreyi. Antimicrob. Agents. Chemother. 1.982. 21: 857-863.
- 17.- Attardo C and Clark V: Transformation of Neisseria cinerea by a gonococcal B-lactamase plasmid. Annual Meeting of the American Society for Microbiology. Washington. Abstract. 1.986. D-103.
- 18.- Macrina FL, Kopecko DI, Jones KR, Ayers DJ and McCowen SM: A multiple plasmid containing Escherichia coli: convenient source of size reference plasmid molecules. Plasmid. 1.978. 1: 417-420.
- 19.- Grinsted J, Saunders JR, Ingrand LC, Sykes RB and Richmond MH: Properties of an R-factor which originated in Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 1.972. 110: 529-537.
- 20.- Thayer JD and Martin JE: Improved medium selective for cultivation of Neisseria meningitidis and Neisseria gonorrhoeae. P. Health. Rep. 1.966. 81: 559-562.
- 21.- Shapiro MA, Heifetz CL and Sesnei JC: Comparison of microdilution and agar dilution procedures for testing antibiotic susceptibility of Neisseria gonorrhoeae. J. Clin. Microbiol. 1.984. 20: 828-830.
- 22.- Catlin WB: Characteristics and auxotyping of Neisseria gonorrhoeae. In Bergan T and Norris JR (eds.). Methods in Microbiology Vol. 10. Academic Press. London, New York, San Francisco. 1.978 pp: 345-381.
- 23.- Kellogs DS, Preacock WL, Deacon WE, Brown L and Pirkle CI: Neisseria gonorrhoeae I. Virulence genetically linked to clonal variation. J. Bacteriol. 1.963.

85: 1274-1279.

- 24.- O'Callaghan CH, Kirby SM, Morris A and Shingler AH: Novel method for detection of beta-lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1.972. 1: 283-288.
- 25.- Washington II JA: Susceptibility test: agar dilution. In: Lennette EH, Balows A, Hausser Jr. WJ and Shadomy HJ (eds.). *Manual of Clinical Microbiology* 4th. ASM. Washington, DC. 1.985 pp: 967-971.
- 26.- Steers E, Foltz EL, Graves BS and Ridans J: An inocula-replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility of antibiotics. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1.959. 9: 307-311.
- 27.- Kado CI and Liu ST: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 1.981. 145: 1365-1373.
- 28.- Horowicz I and Burke JF: Rapid and efficient cosmid vector cloning. *Nucleic Acid. Res.* 1.981. 9: 2989-2992.
- 29.- Eckhardt T: A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid.* 1.978. 1: 584-588.
- 30.- Cornelis G, Bennett PM and Grinsted J: Properties of pGC 1, a lac plasmid originating in Yersinia enterocolitica 842. *J. Bacteriol.* 1.976. 127: 1058-1062.
- 31.- Langridge J and cols: Extraction of nucleic acid from agarose gels. *Anal. Biochem.* 1.980. 103: 264-267.

- 32.- Thomas CM: Analysis of clones. En: Bennet PM and Grinsted J (eds.). Method in Microbiology. Academic Press. London. 1.984 pp: 163-195.
- 33.- Girvitz SC, Bacchetti S, Rainbow AJ and Graham FL: A rapid and efficient procedure for the purification of DNA from agarose gels. Anal. Bioch. 1.980. 106: 492-496.
- 34.- Digestion DNA with restriction endonucleases. En: Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J (eds.). Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 1.982 pp: 104-105.
- 35.- Mandel M and Higa A: Calcium dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 1.970. 53: 154-158.
- 36.- Southern E: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gels electrophoresis. J. Mol. Biol. 1.975. 98: 503-509.
- 37.- Percival A, Rowlands J, Alergant CD, Arya OP, Rees E and Annels EH: Penicillinase-producing gonococci in Liverpool. Lancet. 1.976. 2: 1379-1382.
- 38.- Ashford WA, Golash RG and Hemming VG: Penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae. Lancet. 1.976. 2: 657-658.
- 39.- Phillips I: Beta-lactamase-producing penicillin resistant gonococcus. Lancet. 1.976. 2: 656-657.
- 40.- Jephcott AE: Epidemiology of resistance in Neisseria gonorrhoeae. J. Antimicrob. Chemother. 1.986. 18: 199-205.

- 41.- Osaba AO, Rotowa NA, Ogubanjo BO and Ochei F: Review of penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae in Ibanda, Nigeria and their susceptibility to antibiotics. Eur. J. Sex. Transm. Dis. 1.984. 1:145-148.
- 42.- Center for Disease Control: Antibiotic-resistant strains of Neisseria gonorrhoeae. MMWR. 1.987. 36 No. 1-18.
- 43.- Perez J, Matas E, Marne C, Marti C, Morera A, Corcoy F, Matas L y Fontanals D: Incremento en la incidencia de gonococos productores de Beta-lactamasa en hospitales comarcales de Cataluña. Enf. Infec. y Microb. Clin. 1.987. 52: 99-102.
- 44.- Sykes RB and Mattew M: The beta-lactamases of gram negative and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. J. Antimicrob. Chemother. 1.976. 2:115-118.
- 45.- Center for Disease Control: Global distribution of penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae. MMWR. 1.982. 31: 1-3.
- 46.- Jones F, Cunningham EJ, Shockley E and Jackson JH: Genetic analysis of spontaneous resistance to Ampicillin in Neisseria gonorrhoeae. Antimicrob. Agents. Chemother. 1.985. 28: 21-27.
- 47.- Dillon JA and Pauze M: Introductory address: Resistance to antimicrobial agents. What next for Neisseria gonorrhoeae ?. Sex. Transm. Dis. 1.984. 11: 353-359.
- 48.- Rice RJ, Biddle JW, Jan Louis YA, Dewitt WE, Blount JH and Morse SA: Chromosomally mediated resistance in

Neisseria gonorrhoeae in the United States: Results of surveillance reporting, 1,983-1.984. J. Infect. Dis. 1.986. 153: 340-345.

- 49.- Hall WH and Opfer B: Influence of inoculum size of comparative susceptibilities on penicillinase-positive and negative Neisseria gonorrhoeae to 31 antimicrobial agents. 1.984. 26: 192-195.
- 50.- Piot P, Van Dyck E, Colaert J and Ursi JP: Activity in vitro of Cefotaxime and other cephalosporins against Neisseria gonorrhoeae. J. Antimicrob. Chemother. 1.980. 6: 47-50.
- 51.- Meheus A, Piot P, Pattyn S, Van Dyck E and Vandenberghe D: Activity in vitro of ten antimicrobial agents against Neisseria gonorrhoeae. A study of the correlation between the sensitivities. Br. J. Vener. Dis. 1.976. 52: 329-332.
- 52.- Lozano MC, Lomas M, Palomares JC y Perea EJ: Estudio de la sensibilidad a 16 agentes antimicrobianos de Neisseria gonorrhoeae. Primer Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Sevilla. 1.984 pag. 191.
- 53.- Korking HC and Ramsaroop V: Susceptibility of Neisseria gonorrhoeae to Ceftrizoxime in vitro and in vivo. Chemother. 1984. 30: 322-326.
- 54.- Van Hoff R, Vanderlinden MF, Hubrechts JM, Butzler JP and Yourassowsky E: In vitro activity of 18 antimicrobial agents against 104 strains on Neisseria gonorrhoeae isolated in Brussell. Current Chemother. 1.977. 1: 188-189.

- 55.- Perez Trallero E, Garcia-Aranzana JM, Cilla G, Vila-plana C y Esteban Infantes M: Resistencia tetraciclínica en Neisseria gonorrhoeae. Segundo Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Palma de Mallorca. 1.986 pag. 274.
- 56.- Perine PL, Totten PA, Knapp JS and cols.: Diversity of gonococcal plasmids, auxotypes and serogroups in Ghana. Lancet. 1.983: 1051-1052.
- 57.- Center for Disease Control: Spectinomycin-resistant penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae (California). MMWR. 1.981. 30: 221-222.
- 58.- Diniega BM, Mitchell BS, Small JW, Khan WN and Stein DC: Effect of Spectinomycin use on the prevalence of Spectinomycin-resistant and of penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae. N. England.J. Med. 1.987. 317: 272-277.
- 59.- Hilton JM, Ison CA and Easman CSF: Testing sensitivity of Neisseria gonorrhoeae to Spectinomycin. Genitourin. Med. 1.985. 61: 241-243.
- 60.- Coovadia YM and Ramsaroop V: In vitro antimicrobial susceptibilities of penicillinase-producing and no penicillinase-producing strains of Neisseria gonorrhoeae isolated in Durban, South-Africa. Antimicrob. Agents. Chemother. 1.984. 26: 770-772.
- 61.- Sparling PF, Guymon L and Biswas G: Antibiotic resistance in the gonococcus. En: Roberts RB (ed.). Wiley J and Sons. New York. 1.977 pp: 112-135.
- 62.- Brunham RC, Fransen L, Plummer F, Piot P, Slaney L,

- Bygdeman S and Nsanze H: Antimicrobial susceptibility testing and phenotyping on Neisseria gonorrhoeae isolated from patient with ophtalmia neonatorum in Nairobi, Kenia. Antimicrob. Agents. Chemother. 1.985. 28: 393-396.
- 63.- Martine P, Van Dyck E and Piot P: In vitro activities of the Spectinomycin analog U-63366 and five quinolone derivates against Neisseria gonorrhoeae. Antimicrob. Agents. Chemother. 1.984. 26: 208-609.
- 64.- Sheld WM: The potencial uses of Ceftriaxona. Eur. J. Clin. Microbiol. 1.983. 2: 485-488.
- 65.- Wise R and Andrew JM: A comparison of the pharmacokinetics and tissue penetration of Ceftriaxone, Moxalactam and Cefotaxime. Eur. J. Clin. Microbiol. 1.983 2: 505-508.
- 66.- Judson FN, Ehret JM and Root CJ: Comparative study of Ceftriaxone and aqueous procaine penicillin G in the treatment of uncomplicated gonorrhoea in women. Antimicrob. Agents. Chemother. 1.983. 23: 218-220.
- 67.- Barry AL, Jones RN, Thornsberry C, Ayers LW, Gerlach EH and Sommers HM: Antibacterial activities of Ciprofloxacin, Norfloxacin, Oxolinic acid, Cinoxacin and Nalidixic acid. Antimicrob. Agents. Chemother. 1.984. 25: 633-637.
- 68.- Shripe L, Saunders J. Traynor R, Koornhof HJ: A laboratory assesment of Ciprofloxacin and comparable antimicrobial agents. Eur. J. Clin. Microbiol. 1.984. 3: 328-332.
- 69.- Crump B. Wise R and Dent J: Pharmacokinetics and tis

- sue penetration of Ciprofloxacin. Antimicrob. Agents. Chemother. 1.983. 24: 784-786.
- 70.- Aznar J, Prados R, Rodriguez Pichardo A, Hernandez I, DeMiguel C and Perea EJ: Comparative clinical efficacy of two different single dose Ciprofloxacin treatments for uncomplicated gonorrhoea. Sex. Trasm. Dis. 1.986. 13: 169-172.
- 71.- Gutschow K, Weissernbacher ER, Walz Ch, Adam D, and Lühr H: Serum and tissue concentrations of Ofloxacin in ginecological infections. Proceedings IV. Mediterranean Congress of Chemotherapy. Rodhos, Greece. 1.985 pp 498.
- 72.- Aznar J, Prados R, Herrera A, Rodriguez Pichardo A and Perea EJ: Single doses of Ofloxacin in uncomplicated gonorrhoea. Drugs. 1.987. 34: 107-110.
- 73.- Isolation of bacteriophage Lambda and plasmid DNA. En: Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J (eds.). Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 1.982 pp: 75-97.
- 74.- Meyers JA, Sanchez D, Elwell LP and Falkow S: Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid DNA. J. Bacteriol. 1.976. 127: 1529-1532.
- 75.- Willshaw GA, Smith HR and Anderson ES: Application of agarose gel electrophoresis to the characterization of plasmid DNA in drug-resistant Enterobacteria. J. Gen. Microbiol. 1.979. 114: 15-19.
- 76.- Macrina FL, Mays TD, Smith CJ and Welch RA: Non plasmid associated transfer of antibiotic resistance in

- Bacteroides. J. Antimicrob. Chemother. 1.981. 8: 79-84.
- 77.- Roberts M, Piot P and Falkow S: The ecology of gonococcal plasmids. J. Gen. Microbiol. 1.979. 144: 491-494.
- 78.- Biswas GD, Graves J, Schwalbe R and Sparling FP: Construction of isogenic gonococcal strains varying in the presence of a 4'2 Kilobases cryptic plasmid. J. Bacteriol. 1.986. 167: 685-694.
- 79.- Miller MA, Anderson P, Parker JW and Rohrer HH: Inhibition of Neisseria gonorrhoeae isolates by Martin Lewi medium epidemiology, susceptibility profile and plasmid analysis. Br. J. Vener. Dis. 1.982. 58: 96-100.
- 80.- Jhonson SR, Anderson BE, Biddle JW, Perkins GH and Sewitt WE: Characterization of concatemeric plasmid of Neisseria gonorrhoeae. Infect. Immun. 1.983. 40: 843-846.
- 81.- Bruton J, Clare D, Ehrman N, and Meier MA: Evolution of antibiotic resistance plasmids in Neisseria gonorrhoeae and Haemophilus influenzae species. Clin. and Investig. Medicin. 1.983. 6: 221-228.
- 82.- Sox TE, Mohammed W and Sparling PF: Transformation derived Neisseria gonorrhoeae plasmid with altered structure and function. J. Bacteriol. 1.979. 138: 510-518.
- 83.- Van Embden JDA, Dessens-Kroon M and Van Klingeren B: A new B-lactamase plasmid in Neisseria gonorrhoeae.

- J. Antimicrob. Chemother. 1.985. 15: 247-250.
- 84.- Young KH, Dillon JR, Pauzé M and Wallace: A novel 4'9 plasmid associated with an outbreak of penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae. J. Infect. Dis. 1.986. 153: 1162-1165.
- 85.- Gouby A, Bourg G and Ramuz M: Previously undescribed 6'6 Kb R plasmid in Penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae. Antimicrob. Agents. Chemother. 1.986 29: 1095-1097.
- 86.- Stiffler PN, Lerner SA, Bonhoff M and Morello JA: Plasmid deoxyribonucleic acid in clinical isolates in Neisseria gonorrhoeae. J. Bacteriol. 1.975. 122: 1293-1300.
- 87.- Flett F, Humpreys GO and Saunders JR: Intraespecific and intergeneric mobilization of non conjugative resistance plasmids by 24'5 Mda conjugative plasmids of Neisseria gonorrhoeae. J. Gen. Microbiol. 1.981. 125: 123-129.
- 88.- Biswas GD, Blackman EY and Sparling PF: High-frequency conjugal transfer of a gonococcal penicillinase plasmid. J. Bacteriol. 1.980. 143: 1318-1324.
- 89.- Ansik-Shipper MC, Bygdeman SM, Van Klingeren B and Sandström EG: Serovars, auxotypes and plasmid contents of PPNG strains from outbreak in Amsterdam. Genitour. Med. 1.987. 63: 157-159.
- 90.- Center for Disease Control: Plasmid mediated Tetracycline resistant Neisseria gonorrhoeae Georgia, Massachusetts, Oregon. MMWR. 1.986. 35: 304-306.

- 91.- Hendry AT and Stewart IO: Auxonographic grouping and typing of Neisseria gonorrhoeae. Can. J. Microbiol. 1.979. 25: 512-521.
- 92.- Alfa MJ, Chen MH and Robertson JA: Effects of Mycoplasma hominis an in vitro studies of Neisseria gonorrhoeae. Sex. Transm. Dis. 1.985. 12: 103-109.
- 93.- Copley CG, Gough K and Egglestone SI: Epidemiological studies of Neisseria gonorrhoeae isolated in The United Kingdom. Eur. J. Epidemiol. 1.985. 1: 166-171.
- 94.- Carifo K and Catlin BW: Neisseria gonorrhoeae auxotyping: Differentiation of clinical isolates based on growth responses on chemically defined media. Appl. Microbiol. 1.973. 26: 223-230.
- 95.- Garcia Moreno J, Dillon JR, Arroyave and cols.: Identification of penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae in Chile during clinical and microbiological study of gonococcal susceptibility to antimicrobial agents. Genitourin. Med. 1.987. 63: 6-12.
- 96.- Dillon JR, Bygdeman SM and Sandström EG: Serological ecology of Neisseria gonorrhoeae (PPNG and non-PPNG) strains: Canadian perspective. Genitourin. Med. 1.987 63: 160-168.
- 97.- Bygdeman SM: Serological classification of Neisseria gonorrhoeae. Relation to antibiotic susceptibility and auxotypes. Epidemiological applications. Ph D. Thesis, Stockholm, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. 1.981.
- 98.- Dillon JR, Carballo MC, King SD and Brathwaite AR:

- Auxotypes plasmids contents and serovars of gonococcal strains (PPNG and non PPNG) from Jamaica. Genitourin. Med. 1.987. 63: 233-238.
- 99.- Dillon JR, Pauzé M and Young KH: Molecular and epidemiological analysis of penicillinase-producing strains of Neisseria gonorrhoeae isolated in Canada 1.976-1.984: Evolution of new auxotypes and B-lactamases encoding plasmids. Genitourin. Med. 1.986. 62: 151-157.
- 100.-Odugbemi TO, Brown ST, Biddle J, Jhonson S, Perkins G, Dewitt W and Albritton WL: Plasmid profile, serogrouping and auxotyping of Neisseria gonorrhoeae isolates from Africa. Br. J. Vener. Dis. 1.983. 59: 41-43.
- 101.-Danielsson D, Bygdeman S and Kallings I: Epidemiology and auxotype patterns of consecutive gonococcal isolates from ten different areas of Sweden. Scand. J. Infect. Dis. 1.983. 15: 34-42.
- 102.-Van Klingeren B, Ansink-Schipper MC, Dessen-Kroon M and Verhuevel M: Relationship between auxotype, plasmid pattern and susceptibility to antibiotics in penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae. J. Antimicrob. Chemother. 1.985. 16: 143-147.
- 103.-Catlin BW and Reyn A: Neisseria gonorrhoeae isolated from disseminated and localised infections in pre-penicillin area. Auxotypes and antibacterial drug resistances. Br. J. Vener. Dis. 1.982. 58: 158-165.
- 104.-Korting HC, Abeck D, and Neubert V: The susceptibility of Neisseria gonorrhoeae strains to different cephalosporins and penicillin G depends on the auxoty-

- pes. Chemother, 1.986. 32: 247-254.
- 105.- Catlin BW and Pace PJ: Nutritional requirements and penicillin susceptibilities of gonococci from pharyngeal and anogenital site. Br. J. Vener. Dis. 1.977. 53: 299-303.
- 106.- Schoolnik GK, Buchanan TM and Holmes KK: Gonococci causing disseminated gonococcal infection are resistant to the bacterial action of normal human sera J. Clin. Invest. 1.976. 58: 1163-1173.
- 107.- Brunham RC, Plummer F, Slaney L, Rand F and Dewitt W: Correlation of auxotypes and Protein I type with expression of disease to Neisseria gonorrhoeae. J. Infect. Dis. 1.985. 152: 339-343.
- 108.- Exner CA, Nash SE, Pace PJ and Catlin WB: Auxotypes and bacterial resistance of gonococci with differing susceptibilities to Vancomycin. Br. J. Vener. Dis. 1.982. 58: 166-175.
- 109.- Sandström EG, Knapp JS, Reller BL, Thompson SE, Hook EW and Holmes KK: Serogrouping of Neisseria gonorrhoeae: Correlation of serogroup with disseminated gonococcal infection. Sex. Transm. Dis. 1.984 11: 77-80.
- 110.- Knapp JS, Lind I, Reyn A and Holmes KK: Unique strains of Neisseria gonorrhoeae during the penicillin era. A study of isolates from Denmark. J. Infect. Dis. 1.986. 154: 363-366.
- 111.- Noble RC and Parekh MC: Changes in the prevalence of auxotypes of Neisseria gonorrhoeae among black and white patients attending a clinic for sexually

transmitted diseases. Sex. Transm. Dis. 1.983. 10: 13-17.

- 112.- Bygdeman SM, Ginellius EC and Sandström EG: A comparison between two different sets of monoclonal antibodies for the serological classification of Neisseria gonorrhoeae. En: Schoolnik GK, Brooks G, Falkow JS, Knapp JS, McCutchan A, Morse S (eds.). The Pathogenic Neisseriae. ASM. Washington, DC. 1.985 pp: 31-36.
- 113.- Copley CG and Egglestone SS: Western blot analysis of gonococcal serogrouping reagents. Genitourin. Med. 1.987. 63: 87-91.
- 114.- Jeurissen SHM, Sminia T and Beuvery EC: Induction of mucosal af Neisseria gonorrhoeae porin proteins. Infect. and Immun. 1.987. 55: 253-257.
- 115.- Bygdeman S, Danielsson D and Sandström E: Gonococcal W serogroups in Scandinavia. Act. Path. Micro. Immun. Scand. 1.983. 91: 293-305.
- 116.- Bygdeman S: Antibiotic susceptibility of Neisseria gonorrhoeae in relation to serogroups. Act. Path. Microb. Immun. Scand. 1.981. 89: 227-237.
- 117.- Rudin AK, Werner YK, Reingertz O, Bygdeman SM, Backmån M and Sandström EG: Use of gonococcal W sero -- grouping in the evaluation of a clinical trial of Rosoxacina. Sex. Transm. Dis. 1.985. 12: 19-24
- 118.- Bygdeman S, Backmån M, Danielsson D and Norgren M: Genetic-linkage between serogroup specificity and antibiotic resistance in Neisseria gonorrhoeae. Act.

Path. Microb. Immun. Scand. 1.982. 90: 243-250.

- 119.- Anderson B, Odugbemi T and Johnson S: Penicillinase producing Neisseria gonorrhoeae strains from Nigeria with Far Eastern type plasmid. Lancet. 1.982. 1: 676-677.
- 120.- Bygdeman SM: Gonorrhoea in men with homosexual contacts serogroups of isolated gonococcal strains related to antibiotic susceptibility, site of infection and symptoms. Br. J. Vener. Dis. 1.981. 57: 320-324.